

MARA ALBONEI DUDEQUE PIANOVSKI KATO

**Avaliação da Quimiotaxia, Redução do NBT, Iodinização
e Poder Bactericida dos Polimorfonucleares Neutrófilos
em Crianças com Anemia Ferropriva, Antes e Após
Administração de Ferro.**

Dissertação ao Nível de Mestrado em
Pediatria, apresentada à Universidade
Federal do Paraná.

— DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA —

CURITIBA

1984

*Dedico este trabalho
a ALBINO e LINDAMIR,
meus pais
a MASSAKAZU, YUKIE E
FÁBIO AKIRA*

AGRADECIMENTOS

A autora expressa seu agradecimento a todos aqueles que colaboraram na realização deste trabalho:

Professor RAUL CORRÊA RIBEIRO, pela amizade e dedicação ímpar na orientação deste trabalho.

Professor Dr. IZRAIL CAT, coordenador do curso de pós-graduação - Mestrado em Pediatria, pelo estímulo e apoio constantes.

Professor JOSÉ FERREIRA CARVALHO, livre docente do Instituto de Ciências Matemáticas de São Carlos - USP, pela análise estatística dos resultados.

Aos Dr. DINARTE JOSÉ GIRALDI, NOBORO MIASAKI e DALTRO ZUNINO, pelo apoio e incentivo.

Ao Professor DOMINGOS JOSÉ FONTANA, Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica e às Dras. ALDA MARIA ROSA DORIGO e JOSIANE MEYER, pelo auxílio no preparo das soluções.

Aos Drs. LEDO DE LA FAYETTE MARTINS MACIEL, LUIZ CARLOS WOELLNER e RENATO JOSÉ RAMOS, do Setor de Medicina Nuclear da

Universidade Federal do Paraná, pelo apoio na realização dos exames de iodinação.

Às bioquímicas do Setor de Bacteriologia do Laboratório do Hospital de Clínicas, Dra. HELENA H. DE MELLO DE SOUZA, LÍBERA MARIA DALLA COSTA e às Sras. ANA TORRES VIEIRA, HONORINA DE ANDRADE SCHMIDT, pelo auxílio na realização técnica do poder bactericida.

Ao técnico de laboratório JOSÉ RENATO SALES BARBOSA, pelo preparo das placas para o poder bactericida.

Ao Sr. OLÍMPIO DE OLIVEIRA LIMA FILHO, pela produção do dispositivo para realização dos orifícios na placa de agarose.

Ao Professor GUIDO FERENCZ, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pelo auxílio na avaliação da quimiotaxia.

À Professora BEATRIZ DE FREITAS, farmacêutica responsável pelo Setor de Bioquímica do Laboratório do Hospital de Clínicas e ao técnico PEDRO HORLAT, desse setor, pelo auxílio prestado.

À Srt.^a LÉA REGINA WELTER e Sra. MARIA DE LOURDES VIZOLLI, do Serviço de Medicina Nuclear, pelo auxílio prestado.

Ao Professor Dr. EURÍPIDES FERREIRA, Drs. MAURO RICHARTZ, FLORA WATANABE, SÉRGIO LUIZ SCHLÖGEL DE AZAMBUJA, ANTONIO

AMARANTE, ELIO TANAKA, por terem encaminhado pacientes para estudo.

As Dras. NOEMI FARAH PEREIRA, MARIA FELICITAS NIEDFELD DE RODRIGUEZ, ROSANA IMARA I. CAETANO, ELVIRA N. DOI E MITOKO KURIKI, do Setor de Imunologia do Laboratório Central da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração técnica.

Aos bioquímicos Dr. MÁRCIO CHEDID e LORITA, pelo apoio e incentivo na realização dos exames.

Às Dras. MARI'STELA D'AGNOLLO MORI, ALZIRA VOLPATO QUINTANEIRO, LISMARA BONFIN DOS SANTOS, CECÍLIA M. TOMIZAWA, SAMIRA FADEL, pela realização dos hemogramas.

Ao Professor ORLANDO TEODORICO DE FREITAS, Titular do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná, ROBIN MARIO HOFMEISTER, professor assistente desse setor, DÉSIREE GISELLE H. RENOUX e professor Dr. GUILBERTO MINGUETTI, pela realização da análise à microscopia eletrônica e das fotomicrografias.

Às Sras. MARIA ALICE KICHEL e ALICE GUIMARÃES DA SILVA, pelas facilidades que proporcionaram ao nosso trabalho no laboratório.

À bibliotecária Sra. RUTH LOBO DOS SANTOS, pela colaboração na revisão bibliográfica.

À Dra. NEIVA ISABEL RODRIGUES MAGDALENA, pelo auxílio na realização das fotomicrografias.

Aos responsáveis pelo CEDIT e pelo Lar Escola Leocádio José Correia, por terem permitido a realização dos exames nas crianças sob seus cuidados.

Ao Sr. ROGÉRIO GROHS, pela realização das fotografias.

Ao MAURICI ZATTA, pela confecção das figuras.

Aos Drs. RENATO DI DIO, ROCHA MARMO DE PAULA E SANDRA CÉLIA DE GALVÃO FERNANDES CABELHO, da CRIESP, pela determinação da ferritina.

Ao Dr. MASSAKAZU KATO, pelo irrestrito e permanente apoio.

Aos Residentes do Departamento de Pediatria, às Dras. MARLENE MYLLA e EDNA KAKITANI, pela colaboração prestada no atendimento aos doentes.

À ANTONIA SCHWINDEN, pelas sugestões e correções do texto.

À Sra. SUELY TEREZINHA KAMINSKI LUIZ, pelo excelente trabalho datilográfico.

Aos colegas de mestrado.

Às crianças com anemia ferropriva.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. INCIDÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE FERRO	2
1.2. CONSEQUÊNCIAS DA DEFICIÊNCIA DE FERRO	7
1.2.1. Alterações não-hematológicas da deficiên- cia de ferro	9
1.2.2. Deficiência de ferro e infecção	14
1.2.2.1. Alterações do sistema de comple- mento	16
1.2.2.2. Alterações dos linfócitos	18
1.2.2.3. Alterações do sistema fagocitário	20
1.3. PROCESSOS BACTERICIDAS DOS PMN E PARTICIPAÇÃO DO FERRO	26
1.3.1. Mecanismos de detoxificação e proteção da célula	
2. OBJETIVOS	40
3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. CASUÍSTICA	43
3.1.1. População de estudo	43
3.2. MATERIAL	44
3.2.1. Equipamentos	44
3.2.2. Reagentes e soluções	47

3.3. MÉTODOS	51
3.3.1. Obtenção do peso e estatura	51
3.3.2. Colheita do material	51
3.3.3. Siliconização	52
3.3.4. Opsonização das partículas de zymosan . .	54
3.3.5. Separação dos polimorfonucleares neutró- filos do sangue periférico	54
3.3.6. Quimiotaxia dos PMN sob agarose	55
3.3.7. Teste da redução do "nitro-blue-tetrazolium"..	62
3.3.8. Iodinização	63
3.3.9. Poder bactericida dos PMN	66
3.3.10. Viabilidade dos PMN	67
3.3.11. Administração terapêutica de ferro. . . .	67
3.3.12. Verificação da fagocitose à microscopia eletrônica	68
4. RESULTADOS	71
5. DISCUSSÃO	87
5.1. FORMAÇÃO DOS GRUPOS	88
5.1.1. Idade	88
5.1.2. Caracterização da anemia por deficiência de ferro	88
5.1.3. Estado nutricional	95
5.1.4. Outras variáveis	96
5.2. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS FUNCIONAIS DOS PMN . . .	97
5.2.1. Quimiotaxia	97
5.2.2. Redução do NBT	99

5.2.3. Poder bactericida	103
5.2.4. Iodinização	106
6. CONCLUSÕES	110
7. ANEXOS	113
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Queixas principais dos pacientes	73
Tabela 2 - Peso e estatura dos controles e pacientes. .	73
Tabela 3 - Valores hematimétricos dos controles e dos pacientes, pré e pós tratamento	75
Tabela 4 - Níveis séricos de ferritina dos controles e dos pacientes	76
Tabela 5 - Resultados de migração dos PMN, para os con- troles e pacientes, pré e pós tratamento . .	78
Tabela 6 - Resultados de redução do NBT, pelos PMN dos controles e dos pacientes, pré e pós trata- mento	79
Tabela 7 - Resultados de iodinação pelos PMN dos pa- cientes pré e pós tratamento	82
Tabela 8 - Resultados do poder bactericida dos PMN dos controles e pacientes, pré e pós tratamento.	85

Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade dos parâmetros utilizados para diagnóstico da anemia por deficiência de ferro	92
Tabela 10 - Avaliação do poder bactericida dos PMN de crianças com anemia por deficiência de ferro	104
Tabela 11 - Resultados de iodinação e oxidação do ¹⁴ C-Formato	107

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Localização do sistema NADPH oxidase, associado à membrana celular	29
Figura 2 - Formação de H_2O_2 a partir da redução do O_2^- .	30
Figura 3 - Formação de H_2O_2 a partir do O_2 sem formar O_2^-	31
Figura 4 - Produção de H_2O_2 pela dismutação do O_2^- . .	31
Figura 5 - Produção de radical $OH\cdot$	32
Figura 6 - Sistema MPO- H_2O_2 -halogênio	34
Figura 7 - Representação esquemática dos processos microbicidas e de detoxificação celular. . .	39
Figura 8 - Localização esquemática das células sanguíneas após centrifugação sobre ficoll-hypaque $d = 1077$	53
Figura 9 - Placa de agarose	57

Figura 10 - Dispositivo padronizado para realização dos orifícios na placa de agarose	58
Figura 11 - Migração dos PMN	59
Figura 12 - PMN em quimiotaxia	60
Figura 13 - PMN em quimiotaxia	61
Figura 14 - Redução do NBT	64
Figura 15 - Eletromicrografia apresentando PMN com bactérias fagocitadas.	69
Figura 16 - Eletromicrografia dos PMN com zymosan fagocitado	70
Figura 17 - Representação gráfica dos resultados de migração dos PMN	77
Figura 18 - Representação gráfica dos resultados de redução do NBT em repouso	80
Figura 19 - Representação gráfica dos resultados de redução do NBT em atividade	81
Figura 20 - Representação gráfica dos resultados de iodinação dos PMN	84
Figura 21 - Representação gráfica dos resultados do poder bactericida	86

LISTA DE ANEXOS

		Página
Anexo I	- Formulário para identificação, história e exame físico, dos pacientes	114
Anexo II	- Identificação, procedência, idade, sexo e cor dos controles	115
Anexo III	- Identificação, procedência, idade, sexo e cor dos pacientes	118
Anexo IV	- Peso e estatura dos controles	119
Anexo V	- Peso e estatura dos pacientes	122
Anexo VI	- Valores hematimétricos dos controles. .	123
Anexo VII	- Valores hematimétricos dos pacientes pré tratamento	126
Anexo VIII	- Valores hematimétricos dos pacientes pós tratamento.	127
Anexo IX	- Leucometria e contagem leucocitária diferencial dos controles	128

Anexo X	- Leucometria e contagem leucocitária diferencial dos pacientes pré e pós tratamento	132
Anexo XI	- Níveis séricos de ferritina dos controles	135
Anexo XII	- Níveis séricos de ferritina dos pacientes	136
Anexo XIII	- Migração dos PMN dos controles	137
Anexo XIV	- Migração dos PMN dos pacientes	138
Anexo XV	- Redução do NBT em repouso e sob estímulo pelos PMN dos controles	140
Anexo XVI	- Redução do NBT em repouso e sob estímulo pelos PMN dos pacientes, pré e pós tratamento.	141
Anexo XVII	- Iodinização pelos PMN dos controles e pacientes, pré e pós tratamento	143
Anexo XVIII	- Poder bactericida dos PMN dos controles	145
Anexo XIX	- Poder bactericida dos PMN dos pacientes pré e pós tratamento.	146

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. INCIDÊNCIA DA DEFICIÊNCIA DE FERRO

A deficiência de ferro é considerada como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Apesar dos esforços empreendidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), no sentido de preveni-la, essa é ainda a carência nutricional mais freqüentemente observada, dependente que é de múltiplas variáveis educacionais e sócio-econômicas de uma população.

Estimativas recentes ⁸⁸ permitem avaliar em mais de 500 milhões o número de seres humanos com deficiência de ferro, existente no mundo inteiro.

Em várias regiões dos Estados Unidos, na última década, foi observada uma incidência relativamente alta de deficiência de ferro, tendo sido detectada em 30% de 3423 crianças menores de seis anos ²¹⁰. A incidência foi maior nas crianças de grupos sócio-econômicos menos favorecidos; entretanto, chamou também a atenção a sua ocorrência em crianças da classe média superior.

Nos países subdesenvolvidos, a incidência da deficiência de ferro é muito maior e a severidade da anemia ferropriva, muito mais intensa ^{43, 69, 90, 164, 168, 177, 186, 199, 204, 209, 241, 259, 269}.

No leste da África, ROWLAND mostrou que a média de hemoglobina foi de 6,93 g/dl entre 406 crianças abaixo de um ano, e de 6,65 g/dl entre 447 crianças de 01 a 05 anos ²³⁵. Em somente 02% das 255 crianças submetidas a aspirado de medula óssea, foram observadas alterações megaloblásticas ²⁸⁶; nas demais as alterações foram representativas de deficiência de ferro.

AKINKUGBE, estudando a prevalência de anemia no oeste da África, verificou que esta ocorreu em 63% das crianças entre 01 e 02 anos de idade, e em 33% quando se considerou a população de crianças de 01 a 10 anos ³.

OLIWENSZTEIN DE RIOS et alii, referindo-se à prevalência da carência de ferro, citam dados da OMS/OPS, segundo os quais, na Índia, é observada em 92,8% ²⁰⁴.

Nos países em desenvolvimento, a deficiência de ferro assume proporções similares às acima citadas. Assim, foi verificada em 72% de 100 crianças atendidas em consulta externa em Montevidéu, em 1980 ²⁰⁴.

Em São Paulo, NUSSENSZVEIG et alii, estudando uma população de escolares de 07 anos de idade, encontraram níveis de hemoglobina abaixo de 11,0 g/dl em 20,1%, com uma grande variação de acordo com o nível sócio-econômico e as condições sanitárias da área analisada. Assim, nas escolas localizadas em subdistritos de nível sócio-econômico mais elevado, a prevalência foi de 8,4%, enquanto nas escolas com população de

nível sócio-econômico mais precário e condições sanitárias deficientes, a anemia ocorreu em 57% dos escolares¹⁹⁹.

No Nordeste brasileiro, no ano de 1965, numa população de 462 indivíduos, mais de 20% eram anêmicos¹⁹⁹.

Na Zona da Mata de Pernambuco, a incidência da anemia em crianças de 05 a 09 anos de idade era de 35,7%¹⁷⁷.

SALZANO encontrou nível de hemoglobina inferior a 11 g/dl em 47,4% de 310 escolares do interior de Pernambuco²⁴¹.

Essa alta incidência é, basicamente, o resultado da carência nutricional, seja pela escassez de alimentos ricos em ferro, tal como a carne, à qual a população de menor poder aquisitivo não tem acesso rotineiramente, seja por um problema educacional, de falta de esclarecimento sobre a biodisponibilidade do ferro presente nos variados alimentos. Por exemplo, o povo sabe que o espinafre é rico em ferro, porém desconhece que este metal, quando presente nesse vegetal e em outros, e na maioria dos cereais, é de absorção e aproveitamento nutritivo mínimos^{55,174,203}.

Além da falta de ingestão, outros problemas responsáveis pela deficiência de ferro, e intimamente relacionados ao subdesenvolvimento, estão ligados às alterações de absorção e às causas crônicas de espoliação e/ou perda de sangue.

Entre os fatores responsáveis pela *alteração da absorção* do ferro, as enteroparasitoses assumem importância pela alta incidência em nosso meio. A *estrongiloidíase*, a *giardíase*, a *teníase* e a *oxiuríase*, nos casos de infestações intensas e duradouras, acarretando anorexia e diarreia, levam a uma redução da absorção intestinal do ferro ^{43, 164, 194, 199}.

A *ascaridíase*, cuja incidência no Brasil é uma das maiores do mundo ¹⁹⁹, pode prejudicar a absorção de ferro, em decorrência de má absorção, secundária à ação estimuladora do peristaltismo intestinal, por ela provocada.

Além desses distúrbios, a própria deficiência de ferro pode resultar em um estado de má absorção desse metal. KIMBER & WEINTRAUB verificaram uma perda da resposta adaptativa normal da absorção de ferro nas crianças com severa deficiência de ferro. Consideraram que essa falta de absorção era devida a alterações funcionais e histopatológicas do trato gastrointestinal, como *acloridria gástrica* e alterações da mucosa duodenojejunal, com depleção das enzimas dependentes de ferro ^{75, 137, 203}. Verificaram, ainda, que após a administração parenteral de ferro, ocorre normalização dessa função, o que corrobora a etiopatogênese proposta.

Entre os fatores que levam à deficiência de ferro por *espoliação e/ou perda* de sangue, novamente chamam a atenção as enteroparasitoses. Entre essas, salienta-se a *ancilostomíase*, pela sua alta incidência ¹⁹⁹. O mecanismo pelo qual a ancilos-

tomíase leva à deficiência de ferro é basicamente o da espoliação de sangue, pelo fato de os parasitas sugarem-no durante toda a sua existência. ROCHE & MARTINEZ-TORRES¹⁷⁵ demonstraram que os vermes sugam e ingerem sangue. Porém, outros autores acreditam que a perda sangüínea ocorra predominantemente como resultado do trauma infligido pelos vermes à superfície mucosa²⁰⁹. Além disso, estes produzem material anticoagulante na sua cápsula bucal, o que pode facilitar a perda de sangue. Existem evidências que, a cada seis horas, migram para uma nova área íntegra de mucosa, ocasionando sangramentos sucessivos. Calcula-se que a perda de sangue produzida pelo *Ancylostoma duodenale* é de 0,16 a 0,34 ml/dia/verme e pelo *Necator americanus*, de 0,03 a 0,05 ml/dia/verme. Considerando-se que as infestações são freqüentemente mistas, é esperada uma perda diária de ferro de 01 mg/dia/1000 ovos por grama de fezes^{25, 90, 154, 209}.

Como a hemorragia ocorre por via intestinal, parte do ferro hemoglobínico é reabsorvida pela mucosa intestinal, de maneira que a anemia tem instalação insidiosa. MASPES & TAMIGAKI verificaram que a reabsorção do ferro hemoglobínico da hemorragia pode atingir até 60% do total¹⁷⁸.

Outra verminose responsável por perda sangüínea é a tricocefalose. Duplo mecanismo leva à deficiência de ferro nessa situação: além de ser considerado um verme hematófago e, portanto, espoliador de sangue, o *Trichiurus* determina o aparecimento de ulcerações intestinais múltiplas, de graus diversos, podendo provocar enterorragias freqüentes. Calcula-se que

a perda diária de sangue através das fezes, em crianças severamente parasitadas, varia de 0,8 a 8,6 ml e que cada verme é responsável pela espoliação de 0,005 ml de sangue^{154, 199}.

Além das parasitoses, outra causa de deficiência de ferro, por perda, é o uso do leite de vaca, não modificado, como alimentação exclusiva nos seis primeiros meses de vida, por induzir uma perda gastrointestinal oculta. Crianças com deficiência de ferro podem perder até 0,3 ml de eritrócitos por dia nas fezes. Quando são alimentadas somente por leite de vaca, essa perda atinge até 1,7 ml de eritrócitos/dia nas fezes, indicando como pode ser severo o sangramento induzido por leite de vaca. Além disso, esse leite propicia um aporte precário de ferro e prejudica a absorção do ferro alimentar^{39, 44, 75, 206, 208, 237}.

É importante o conhecimento dessas causas da deficiência de ferro, tanto para a elaboração do tratamento efetivo como para prevenção a nível individual e de saúde pública.

1.2. CONSEQUÊNCIAS DA DEFICIÊNCIA DE FERRO

A consequência mais conhecida e estudada da deficiência de ferro é a anemia ferropriva, que decorre da falta de ferro nos depósitos teciduais, com conseqüente insuficiência desse metal para os eritroblastos da medula óssea, levando a uma diminuição na produção de eritrócitos. A anemia ferropriva é de instalação insidiosa e a progressão da sintomatologia é gradativa.

Os sinais e sintomas que se desenvolvem como resultado direto da diminuição de hemoglobina são: palidez de pele e mucosas e, como consequência da menor oferta de oxigênio aos tecidos, taquicardia, palpitação, taquipnéia, cefaléia - todas manifestações de adaptação cardiovascular à anemia.

No paciente com anemia ferropriva típica, as alterações laboratoriais encontradas são, por um lado, uma consequência da *diminuição de hemoglobina*, que acarreta produção de eritrócitos com um volume menor do que aquele encontrado no indivíduo sem carência de ferro e, por outro, da *diminuição do ferro corporal*, que leva a uma diminuição da saturação da transferrina, com elevação dos níveis dessa proteína livre no soro, e a um declínio da produção de ferritina, que reflete os depósitos teciduais de ferro. Além dessas alterações, na deficiência de ferro o nível de protoporfirina eritrocitária se torna elevado, pois sendo esta a precursora imediata na síntese do heme, vai ser acumulada pela falta daquele metal em quantidades adequadas para a incorporação no produto final.^{29,}

49

Embora tradicionalmente a deficiência de ferro tenha sido relacionada à anemia, estudos recentes demonstram que a falta desse metal compromete sistemicamente o organismo, por vezes com consequências mais sérias para o paciente pediátrico do que aquelas da anemia por si. O estado precedente a esta alteração hematológica, ou seja, o da carência de ferro, sem comprometer o nível de hemoglobina, é conhecido como *deficiência de ferro sem anemia*^{73, 206}.

1.2.1. Alterações não-hematológicas da deficiência de ferro

A nível celular, a falta de ferro interfere em diversos sistemas moleculares relacionados com a produção de energia e síntese protéica. Desta forma, na deficiência de ferro tem sido evidenciada diminuição na atividade do sistema citocromo-oxidase, da síntese de mioglobina, da atividade da catalase e glutathion-peroxidase, assim como das proteínas ferro-sulfúricas e metaloflavoproteínas, como a NADH desidrogenase, succinato-desidrogenase e xantino-oxidase ^{32, 73, 74, 76}.

A importância fisiopatológica das alterações acima referidas pode ser verificada em vários órgãos e sistemas. Sabe-se, por exemplo, que a simples ausência de ferro nas unhas torna-as frágeis, quebradiças e côncavas, caracterizando-as em forma de colher, conhecida como coiloníquia ^{255, 284}.

Nos sistemas orgânicos que dependem de uma reposição epitelial constante também se verificam alterações. No epitélio bucal, observa-se atrofia das papilas linguais, que pode levar a dor e ardência lingual, espontâneas ou estimuladas por alimentos sólidos ou líquidos ²⁸⁴. Os cantos da boca podem apresentar ulceração ou fissura. Nesse epitélio, tem se verificado atividade reduzida do sistema citocromo-oxidase ⁷⁶.

Comprometimento do epitélio gástrico pode ocorrer com conseqüente hipocloridria, além de diminuição da secreção de pepsina e fator intrínseco ²⁸⁴.

A nível intestinal, alterações da mucosa levam a má absorção de xilose e gorduras, sangramento oculto, absorção diminuída de ferro e enteropatia exsudativa²⁰⁸.

HALL descreveu a presença de escleróticas azuladas em associação com essa carência nutricional¹¹⁰.

Algumas crianças com deficiência de ferro, após a ingestão de beterraba, apresentam urina intensamente corada, fenômeno conhecido como "betúria". Acredita-se que a fisiopatologia dessa alteração resida na absorção de betanina pela apoferritina da mucosa duodenal. Essa proteína, presente na célula epitelial intestinal e responsável pela absorção de ferro, na deficiência deste promoveria absorção de pigmentos como a betanina, por não fazer distinção entre esta e o átomo de ferro¹⁹⁴.

Todas estas alterações são corrigidas pela administração de ferro.

Outra manifestação não-hematológica da deficiência de ferro é o retardo no ganho ponderal. Tem se observado que um grande número de crianças com deficiência de ferro se apresenta com peso abaixo do esperado para sua idade e estatura. JUDISH et alii. analisaram o peso e estatura de 156 crianças abaixo de 03 anos de idade: as estaturas tiveram distribuição normal, porém houve um número desproporcional de crianças com peso inadequado, sendo em 31% dessas abaixo do décimo percentil.

Em 88 crianças estudadas, foi possível acompanhar o ganho ponderal após tratamento com ferro. De 22 crianças abaixo do décimo percentil, 13 ganharam peso situando-se acima desse percentil. Antes da terapêutica ainda, 14 crianças apenas estavam acima do 75º percentil; após, 22 crianças ocuparam essa posição¹³².

Os autores dispunham da curva ponderal de 57 crianças desde o nascimento até a idade na qual o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro foi feito. Eles verificaram dois padrões de ganho de peso em relação à instalação da deficiência de ferro: um grupo de crianças desacelerava o ganho de peso, passando para um percentil abaixo do qual estava desenvolvendo e, após a administração de ferro, retornava ao percentil inicial. O outro grupo, embora apresentasse ganho de peso seguindo o percentil inicial, após receber a terapia com ferro, apresentava aceleração no ganho de peso, passando para um percentil acima.

As razões para a preponderância de um baixo peso na criança com deficiência de ferro não são bem conhecidas. Vários fatores dependentes desse metal podem ser os responsáveis pela desaceleração do crescimento ponderal, entre eles, a anorexia, distúrbios na síntese de DNA e RNA, alterações na função do intestino delgado com prejuízo na absorção de nutrientes, e deficiência de compostos que contêm ferro ou que dele dependem durante os processos mitóticos²⁰⁶.

A diminuição da atividade física e o baixo rendimento muscular, há muito relacionados com os estados anêmicos, são também decorrentes de deficiência de ferro. Acreditava-se que a diminuição do desempenho físico era devida à pouca quantidade de oxigênio liberado no tecido muscular, em função da anemia. Contudo, CLEMENT FINCH, usando modelo experimental com ratos, demonstrou que a deficiência isolada de ferro pode ser a causa da diminuição da atividade física, mesmo na ausência de anemia ^{82, 89, 194}.

Os estudos experimentais com ratos também demonstraram que a diminuição da força muscular estava associada à diminuição da enzima alfa-glicerofosfato-oxidase, enzima mitocondrial que contém ferro, que é responsável pela fosforilação oxidativa; com essa alteração, há uma baixa produção de energia, levando à formação aumentada de lactato durante o trabalho ⁸⁹.

Outras alterações, sem base fisiopatológica bem definida e muito difícil de se comprovar laboratorialmente, também têm sido verificadas na deficiência de ferro. Elas estão relacionadas a manifestações neurológicas e psicológicas.

É muito conhecida em nosso meio a alteração do apetite caracterizada por ingestão de terra ou gelo, comum na criança com deficiência de ferro. Essas manifestações, que Hipócrates já havia descrito como "desejo anormal de comer terra" associado a "alterações do sangue", são agora atribuídas à deficiência desse metal e comprovadamente reversíveis com a terapêutica ¹⁸¹.

A irritabilidade e a falta de interesse pelo ambiente são também alterações encontradas freqüentemente nos lactentes com deficiência de ferro ^{206, 207}.

OSKI et alii. avaliaram o desenvolvimento mental de crianças com deficiência de ferro, submetendo-as ao teste de Bayley, antes e após suplementação com esse metal. Os "scores" obtidos antes e depois do tratamento com ferro apresentaram valores significativamente mais altos depois do tratamento ²⁰⁷. Sugerem os autores que as catecolaminas e serotoninas podem ser as responsáveis por essas alterações. Essa hipótese encontra apoio nos estudos de MACKLER et alii. que evidenciaram uma redução de 35% da atividade da aldeído-oxidase, no cérebro dos ratos deficientes em ferro ¹⁶⁹. A aldeído-oxidase é uma enzima necessária na degradação da serotonina; sabe-se que níveis elevados dessa podem produzir diminuição da atenção. Concomitantemente, observaram um aumento de 15% na concentração de compostos 5-hidroxi-indol cerebral. Os autores apontam para a similaridade do comportamento (responsividade diminuída e dificuldade de aprendizagem) entre os indivíduos com deficiência de ferro e aqueles com deficiência de fenilalanina-hidroxilase e conseqüentes níveis elevados de triptofano cerebral ¹⁵⁹.

VOORHESS et alii. relataram que crianças deficientes em ferro apresentam quantidades aumentadas de norepinefrina na urina, provavelmente como resultado da deficiência de monoamino-oxidase, e que a excreção urinária de norepinefrina retornou ao normal dentro de cinco dias após a administração de ferro ²⁷⁸.

DALLMAN demonstrou que déficits permanentes de ferro não-heme (enzimas, ferritina) são encontrados no cérebro de ratos privados desse metal do 10º ao 28º dia de vida, mesmo tendo posteriormente passado a recebê-lo em quantidade adequada ⁷⁵.

Ainda DALLMAN apontou, em publicação anterior, para o fato de que aspectos fundamentais de desenvolvimento do cérebro humano (proliferação glial, mielinização e arborização dendrítica) ocorrem durante o período caracterizado por possível queda nos depósitos de ferro na criança, exauridos pela sua utilização no crescimento ⁷².

Com base nos trabalhos citados, LEIBEL et alii. comentam que se o ferro influencia o metabolismo cerebral e visto que no ser humano existe uma idade crítica para a especialização dos neurônios, a ocorrência nesta época de um estado de deficiência de ferro poderia torná-los vulneráveis a anormalidades estruturais definitivas, não alteráveis pela subsequente restauração da ingesta de ferro. Por outro lado, nas crianças maiores e adultos, cujo crescimento cerebral já está completo, o impacto da deficiência de ferro poderia se refletir mediante sinais neurológicos ou psicológicos decorrentes de alterações da função neurotransmissora do metabolismo oxidativo ^{159, 187}.

1.2.2. Deficiência de ferro e infecção

Às alterações clínicas já enumeradas, soma-se a observação de que crianças com deficiência de ferro têm resistência diminuída a infecções.

MACKAY realizou um estudo longitudinal com suplementação fêrrica no primeiro ano de vida e observou que as crianças que a receberam apresentaram menos episódios de gastroenterite e infecções pulmonares do que as crianças do grupo controle, sem a suplementação fêrrica. Segundo seu estudo ainda, a recuperação dos episódios de gastroenterite também foi mais rápida nesses do que nos do grupo controle ¹⁶⁸.

Em outra análise, feita em crianças no primeiro ano de vida, em Chicago, ANDELMAN & SERED verificaram que a frequência de infecções respiratórias foi significativamente menor nas crianças que receberam suplementação fêrrica do que nas do grupo controle ⁹.

Entretanto, BURMAN analisando dois grupos de crianças da Inglaterra, um recebendo suplementação fêrrica e outro não, durante um período de observação que variou de 03 a 24 meses, não encontrou relação entre a incidência de infecção e a suplementação fêrrica ⁴⁴.

JAMES & COMBES também não observaram diferença na incidência de infecções nos prematuros que receberam ou não ferro-dextran intramuscular ¹²⁷.

Alguns trabalhos, inclusive, apontam a suplementação fêrrica profilática como responsável por uma maior incidência de infecções. Assim é que BARRY & REEVE citam um aumento na incidência de meningite e septicemia por *E.coli* em neonatos que receberam ferro profilático, bem como um declínio nessa incidência quando tal conduta foi suspensa ²⁹.

Os mesmos autores observaram que a incidência de septicemia por Gram-negativos foi 20 vezes maior durante o período em que era rotina a administração de ferro-dextran injetável nos neonatos²⁹. Ressalte-se, no entanto, que essas crianças receberam doses relativamente altas de ferro (100 mg), administradas parenteralmente. Não se têm evidências que incriminem doses menores no desenvolvimento de infecções²⁶⁰.

Em vista de os resultados de observação clínica serem controversos em relação ao papel do ferro no desenvolvimento de infecções, muitos autores iniciaram estudos para a verificação de sua influência nos sistemas específicos relacionados à defesa do hospedeiro contra infecções.

1.2.2.1. Alterações do sistema de complemento

O sistema de complemento é composto por uma série de proteínas séricas que interagem seqüencialmente, podendo ter como resultado final a lise celular. Eventualmente um dos seus componentes (C3b), após a ativação, liga-se à superfície de uma grande variedade de substâncias permitindo que essas sejam reconhecidas pelos fagócitos facilitando, dessa forma, a fagocitose, fenômeno esse conhecido como opsonização.

Classicamente, o modelo laboratorial para avaliar tal sistema baseia-se na lise de eritrócitos ligados a anticorpos (EA), verificando-se então o menor volume de soro necessário para produzir 50% de hemólise de uma quantidade padrão de EA. Esse volume de soro equivale a uma unidade de CH50.

Os componentes individuais do sistema de complemento, mais freqüentemente C3, podem também ser quantificados mediante ensaios imunquímicos, tais como a imunodifusão radial.

JAGADEESAN & REDDY analisaram os níveis de CH50 e C3 em 98 crianças, das quais 70 apresentavam anemia por deficiência de ferro. Os níveis de CH50 foram significativamente mais baixos nas crianças com anemia, quando comparados com aqueles do grupo normal. A concentração de C3 mostrou uma diminuição progressiva com a diminuição dos níveis de hemoglobina, tendo ocorrido uma redução significativa quando esses caíram abaixo de 8 g/dl.

Os autores sugerem que, sabendo-se que a administração de ferro medicinal estimula a síntese protéica, a falta desse metal poderia ser responsável por uma diminuição na síntese das proteínas do complemento, justificando os resultados acima citados ¹²⁶.

CHANDRA et alii. também encontraram níveis séricos de complemento C3 mais baixos nas crianças com anemia por deficiência de ferro; entretanto, os resultados não foram significativamente diferentes daqueles dos controles ⁵⁴.

Por outro lado, esses dados não foram confirmados por MACDOUGALL et alii, que demonstraram CH50 em níveis normais e C3 em níveis elevados, nos pacientes com anemia por deficiência de ferro ¹⁶⁷.

1.2.2.2. Alterações dos linfócitos

Os linfócitos são as células responsáveis pela resposta imune específica do organismo. Várias funções relacionadas com a imunidade são mediadas por essas células. Dois grandes grupos de linfócitos foram caracterizados segundo as suas propriedades de membrana e funcionais:

- a) os linfócitos T, que se caracterizam por formar rosetas com eritrócitos de carneiro e por responderem ao estímulo "in vitro" a determinados mitógenos, tais como fitohemaglutinina (PHA), "pokeweed" (PWM) e concanavalina A (ConA). Esses linfócitos são os efetores da imunidade celular, que está relacionada com resposta a enxertos, defesa contra fungos e protozoários, além de mediar a resposta cutânea a certos antígenos inoculados por esta via;
- b) os linfócitos B, que se caracterizam por apresentar imunoglobulinas de superfície, formar rosetas em presença de eritrócitos ligados ao complemento e também por responderem "in vitro" a mitógenos, como o PWM. Esses linfócitos são os efetores da imunidade humoral, que está relacionada à produção de anticorpos.

Quantitativamente, o número de linfócitos que formam rosetas com hemácias de carneiro foi determinado por VAN HEERDEN et alii, estando dentro do normal nos pacientes com deficiência de ferro²⁷⁵.

JOYNSON et alii. estudaram a integridade funcional dos linfócitos do sangue periférico, avaliando a transformação desses linfócitos à fitohemaglutinina e a produção de fator inibidor dos macrófagos, em 12 pacientes com anemia ferropriva. Ambas as provas funcionais mostraram resposta diminuída nesses pacientes quando comparados com os controles normais ¹³¹.

MACDOUGALL et alii. também encontraram incorporação de timidina diminuída quando os linfócitos de 20 crianças com anemia por deficiência de ferro e sete com deficiência de ferro, porém sem anemia, foram estimulados com fitohemaglutinina e antígeno de *Candida*. Realizaram ainda testes cutâneos de hipersensibilidade retardada, com toxóide diftérico, candidina e estreptoquinase-estreptodornase, obtendo reações negativas nos mesmos pacientes ¹⁶⁷.

Resultados semelhantes foram obtidos por VAN HEERDEN et alii. estudando as respostas blastogênicas à fitohemaglutinina e concanavalina; encontraram-nas diminuídas significativamente nas crianças com deficiência de ferro (9) e anemia ferropriva (12), em relação aos controles normais (22), todos com idade entre 06 e 24 meses. Quando analisaram a resposta à concanavalina, observaram valores mais altos no grupo com deficiência de ferro sem anemia. Segundo os autores, esse fato pode indicar que a severidade da deficiência está relacionada com a imunocompetência do indivíduo ²⁷⁵. Já as anormalidades de diminuição da resposta blastogênica dos linfócitos à fitohemaglutinina, possivelmente resultam da síntese alterada de DNA e da diminuição da proliferação celular devida a menor atividade da ribonucleotídeo-redutase ²⁷⁵.

Alguns estudos "in vitro" mostram a influência do ferro sobre a resposta proliferativa dos linfócitos de adultos normais quando estimulados pelos mitógenos fitohemaglutinina (PHA), "pokeweed" (PWM) e concanavalina A. BRYAN E LESCH verificaram diferentes efeitos nas respostas aos diferentes mitógenos. Assim, embora o ferro facilite a resposta ao PWM, a suprime à PHA e possivelmente à concanavalina. Chamam a atenção para o fato de que esses achados corroboram a hipótese de que o ferro regula funções imunes. Sugerem que ao menos dois mecanismos podem explicar o efeito do ferro sobre a resposta proliferativa dos linfócitos: modulação da ação de certas enzimas intracelulares ou proteínas envolvidas na resposta e regulação ou expressão de certos receptores envolvidos na divisão dos linfócitos ou na ligação ao PWM ⁴¹.

KULAPONGS et alii. não confirmaram essas anormalidades com a resposta dos linfócitos de pacientes com anemia por deficiência de ferro à PHA, por eles estudados ¹⁵⁰.

1.2.2.3. Alterações dos sistema fagocitário

No que concerne ao sistema fagocitário, que constitui a primeira linha de defesa do organismo no combate às infecções, tem se observado que a deficiência de ferro pode produzir importantes alterações funcionais, principalmente no que diz respeito aos polimorfonucleares neutrófilos (PMN).

Imediatamente após a invasão de um microorganismo, três fases sucessivas são desencadeadas: o deslocamento ativo do

neutrófilo, conhecido como quimiotaxia, até o foco infeccioso; a ingestão do microorganismo ou fagocitose propriamente dita; e, finalmente, a utilização de proteínas e a "explosão" do metabolismo oxidativo, com a finalidade de causar a morte e degradação bacteriana.

Cada uma dessas etapas já foram estudadas em crianças com anemia por deficiência de ferro e os resultados desses estudos são relacionados a seguir.

MACDOUGALL estudou a quimiotaxia "in vitro" dos PMN de pacientes com deficiência de ferro. Ele observou que não houve diferenças nos resultados obtidos entre os pacientes e o grupo controle, quando a endotoxina foi ativada com pool de soro normal. Entretanto, quando incubou a endotoxina com soro de pacientes com deficiência de ferro, houve um aumento da resposta quimiotática dos PMN, tanto dos pacientes como dos controles ¹⁶⁷.

VAN HEERDEN et alii também não encontraram diferença na quimiotaxia dos PMN de crianças deficientes em ferro. Os mesmos autores, analisando a fagocitose, observaram estar normal ²⁷⁵.

MACDOUGALL estudando a ativação do metabolismo oxidativo, mediante a redução do "nitroblue tetrazolium" (NBT) pelos PMN, encontrou valores normais para as crianças com deficiência de ferro ¹⁶⁷. Outros autores, entretanto, verificaram diminuição da redução do NBT pelos PMN de crianças com deficiência de ferro ⁵².

Por outro lado, há evidências indicando que o resultado final do processo bactericida, ou seja, a destruição do microorganismo pelos PMN, está comprometido, na deficiência de ferro. Tais evidências compreendem os trabalhos de ARBETER et alii, na Colômbia, que estudaram um grupo de crianças com desnutrição: das nove com deficiência de ferro, oito apresentaram diminuição do poder bactericida dos PMN; após a administração de ferro a essas crianças, houve um retorno à normalidade em seis pacientes¹⁴.

CHANDRA⁵² estudou o poder bactericida dos PMN em 12 crianças com anemia ferropriva, tendo o cuidado de excluir pacientes com desnutrição, e encontrou diminuição dessa função. Esses pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com os níveis de ferro sérico: um grupo com ferro sérico abaixo de 20 µg/100 ml classificado como severamente deficiente, e um grupo com ferro sérico variando entre 21 e 49 µg/100 ml classificado como moderadamente deficiente. O autor verificou que as médias, tanto do grupo moderadamente como do severamente deficiente em ferro, foram significativamente menores do que aquelas do grupo controle. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo moderadamente e o severamente deficiente, existindo até uma média maior para o último grupo.

Esse fato, até certo ponto surpreendente, foi interpretado pelo autor como sendo decorrente de duas situações: ou já existe nos moderadamente deficientes um comprometimento máximo do poder bactericida dependente de ferro, ou então nos

severamente deficientes em ferro, a baixa concentração desse metal nos PMN é um fator limitante para o crescimento bacteriano⁵⁴.

As anormalidades da referida função neutrofílica foram corrigidas em quatro a sete dias, após administração de ferro, ainda sem alteração apreciável do nível de hemoglobina, o que aponta para a deficiência de ferro como sendo a causa do defeito.

MACDOUGALL et alii, estudando PMN de 20 crianças com anemia por deficiência de ferro, também encontraram diminuição do seu poder bactericida em relação aos PMN dos controles¹⁶⁷.

Portanto, os trabalhos publicados sugerem que, das funções neutrofílicas, principalmente aquela relacionada diretamente com a morte da bactéria está alterada.

A base bioquímica do defeito bactericida nessa deficiência nutricional não está bem estabelecida, porém se acredita que resida em parte a nível enzimático, comprometendo principalmente a mieloperoxidase, enzima que contém ferro na forma de heme²³¹.

Considerando a possibilidade de um comprometimento da mieloperoxidase, SAGONE & BALCERZAK determinaram os valores médios dessa enzima em pacientes deficientes em ferro. Embora os resultados não tenham sido diferentes do normal, em 13 de 18 pacientes, foram inferiores²⁴⁰.

PRASAD estudou a atividade da mieloperoxidase em sete indivíduos anêmicos por deficiência de ferro e a encontrou reduzida ²²¹.

O ferro pode também participar de processos bactericidas independentes da mieloperoxidase, tais como o sistema citotóxico formado por $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{halogênio}$, outras reações que fornecem radicais derivados do oxigênio, ou ainda sob a forma de lactoferrina; esta última, embora de propriedades mais bacteriostáticas que bactericidas, pode atuar sinergicamente com outros sistemas microbicidas da célula ^{39, 143}.

Existem evidências de que a correção da atividade enzimática e mitocondrial de alguns sistemas, na deficiência de ferro, ocorre muito antes do que a correção da anemia. Essa normalização mais rápida poderia estar associada ao grau de renovação celular e/ou de estruturas subcelulares.

DALLMAN verificou que o tratamento com ferro por um período de dois dias foi suficiente para a normalização da atividade citocromo-oxidase das células da mucosa intestinal ⁷⁶.

Nos sistemas celulares que não possuem uma taxa de renovação acelerada, foi verificado que a função mitocondrial normalizou dentro de cinco dias da instituição do tratamento ⁷⁴.

CHANDRA refere normalização das funções dos PMN de crianças com anemia por deficiência de ferro após a administração desse metal, sob a forma de ferro-dextran, dentro de

três a sete dias. Esses dados sugerem que este é um tempo suficiente para que ocorra a reposição dos sistemas enzimáticos dessa célula⁵².

Visto que a anemia por deficiência de ferro tem elevada incidência na nossa população pediátrica; que existem evidências clínicas de uma maior ocorrência de infecções nessa situação; que os sistemas enzimáticos bactericidas dos PMN dependentes do ferro poderiam estar comprometidos; ainda, considerando que os dados sobre a avaliação das funções dessas células nessa deficiência são discordantes, achamos importante estudar diferentes etapas de tais funções em crianças com anemia por deficiência de ferro, antes e após a administração de sulfato ferroso, por um período de três a sete dias.

1.3. PARTICIPAÇÃO DO FERRO NOS PROCESSOS BACTERICIDAS DOS PMN

1.3. PARTICIPAÇÃO DO FERRO NOS PROCESSOS BACTERICIDAS DOS PMN

ELIA METHNIKOFF, há 100 anos, publicou os primeiros trabalhos referentes à sua observação sobre a capacidade dos neutrófilos e macrófagos de ingerir e desintegrar bactérias ¹⁶.

Embora vários tipos de células possam ocasionalmente englobar partículas, os neutrófilos, monócitos sangüíneos e macrófagos teciduais são os fagócitos "profissionais", assim chamados porque esta é a sua missão principal ¹⁰⁹.

Os neutrófilos, que são os mais importantes desses fagócitos, são produzidos na medula óssea e têm como característica peculiar a sua enorme produção, que corresponde a 126 milhões de células por dia, num homem de 70 kg ¹⁶. A sua sobrevivência no sangue periférico é de seis a sete horas, muito menor do que o tempo de sua permanência na medula óssea, que é de cerca de oito dias, período no qual toda uma maquinaria se desenvolve para torná-los aptos à fagocitose ²³⁰.

Para que se proceda a fagocitose, quando uma partícula estranha é depositada num tecido do hospedeiro, esta deve se ligar a receptores específicos da membrana celular do fagócito. Essa ligação pode ser facilitada pela união prévia da partícula a determinadas proteínas do hospedeiro, tais como imunoglobulinas ou complemento, que agem como opsoninas, facilitando o reconhecimento da partícula pela referida célula. Após o reconhecimento, essas partículas estranhas são englobadas pelo fagócito e internalizadas nos vacúolos citoplasmáticos; estes

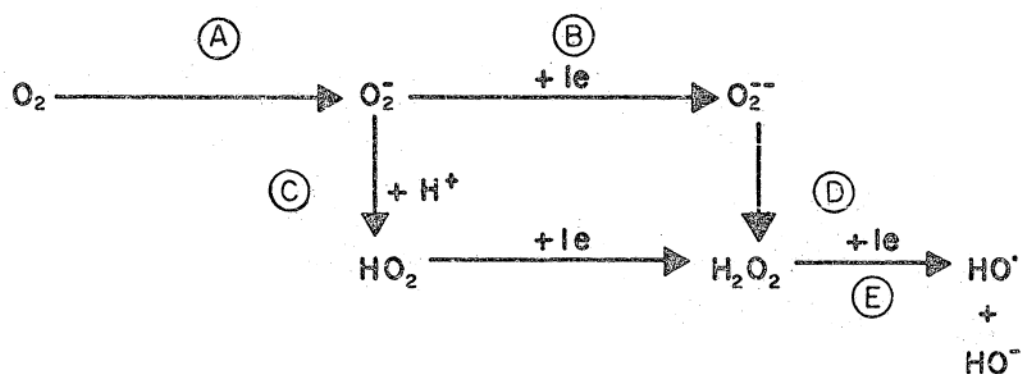
fundem-se com os grânulos de lisossomos, formando o fagolisossomo, no processo conhecido como degranulação.

Nesses grânulos residem as enzimas que, a partir do O_2 , produzem os radicais que causam a morte e a degradação da bactéria^{17, 109}.

Na produção desses radicais, participam vários sistemas enzimáticos. Entre esses, salienta-se pela importância o que depende da mieloperoxidase (MPO). Esta é uma enzima com alta concentração nos neutrófilos, entre 01% a 05% do peso seco da célula, e que possui ferro, na forma de heme, na sua estrutura molecular¹³⁹.

Seguindo-se ao reconhecimento de um estímulo solúvel ou fagocítico, neutrófilos e macrófagos apresentam um aumento de duas a vinte vezes no consumo de O_2 . Esse fenômeno é denominado "explosão respiratória", sendo uma consequência da ativação da via metabólica hexosemonofosfato, com aumento do consumo de O_2 e produção de radicais livres derivados do oxigênio.

O consumo de O_2 é o resultado da sua utilização pelos PMN, para a produção dos radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^-) e oxigênio "singlet" (1O_2). Com exceção deste último, que se forma por alteração do nível de energia de O_2 molecular, as demais formas ativadas resultam de sua redução, por captação sucessiva de elétrons, num esquema em cascata (representado pelas reações A,B,C,D,E)¹⁰⁹.



O sistema enzimático responsável pelo aumento do consumo de O_2 e produção desses radicais parece ser dependente de uma oxidase nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH, NADPH), associada à membrana celular¹⁰³. Segundo BABIOR et alii, os sítios de ligação para o NADH (NADPH) se situam na superfície citoplasmática da membrana, enquanto o componente oxidase, formador de $\text{O}_2^{\cdot-}$ deve se localizar na camada lipídica bimolecular, com uma porção exposta à superfície citoplasmática. Assim, NADPH e NADH são encontrados no citoplasma e $\text{O}_2^{\cdot-}$ é produzido interna ou externamente à superfície citoplasmática^{16, 103}. (Figura 1).

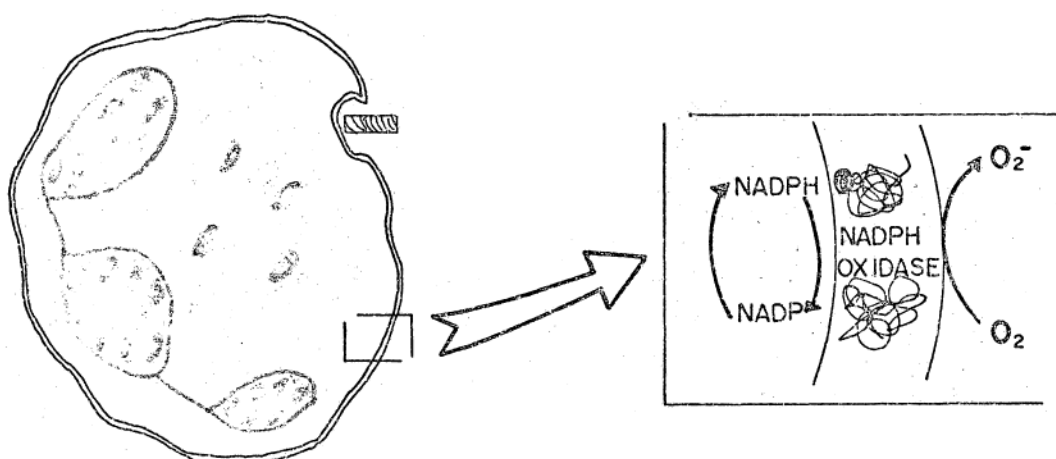


Fig. 1 - LOCALIZAÇÃO DO SISTEMA NADPH OXIDASE, ASSOCIADO À MEMBRANA CELULAR.

O NADPH provém do maior consumo de glicose, com ativação da via hexosemonofosfato, que ocorre à medida que o metabolismo microbicida é ativado.

Os radicais produzidos pela redução do O_2 podem reagir entre si ou com outros elementos resultando em produtos intermediários ou finais que agem sobre as bactérias, destruindo-as
16,84,139,272

O ânion superóxido (O_2^-) pode atuar como oxidante ou redutor, dependendo do substrato com o qual reage⁸⁴. Quando atua como oxidante, ganhando um elétron, pode ser fonte de H_2O_2 (reação C, figura 7). Quando atua como redutor, pode agir sobre o ferricitocromo ou então, como se verifica "in vitro", sobre o NBT.

Se duas moléculas de O_2^- reagem entre si, uma é oxidada e outra reduzida, formando H_2O_2 e O_2 ⁸⁴ (figura 2; reação F, figura 7).

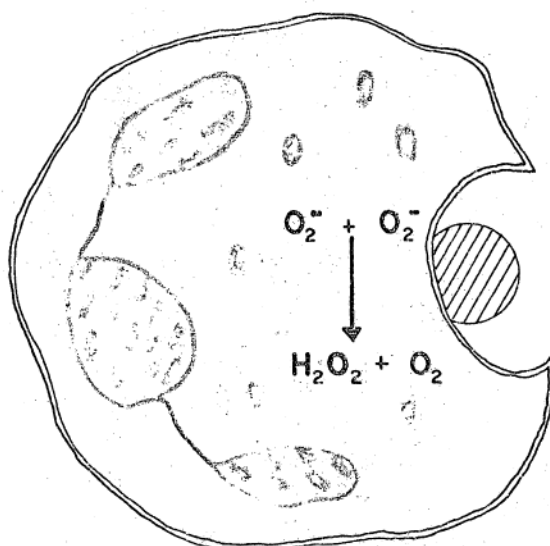


Fig.2 - FORMAÇÃO DE H_2O_2 A PARTIR DA REDUÇÃO DO O_2^- .

Além da formação do H_2O_2 a partir da redução do ânion superóxido, ele pode provir da dupla redução direta do O_2 , sem a formação intermediária de $\text{O}_2^{\cdot -}$, como ocorre, por exemplo, na reação entre glicose e glicose oxidase^{16,108} (figura 3).

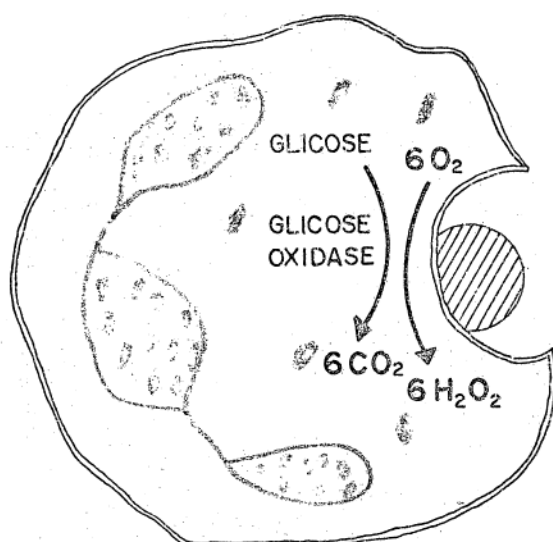


Fig. 3 - FORMAÇÃO DE H_2O_2 A PARTIR DO O_2 SEM FORMAÇÃO DE $\text{O}_2^{\cdot -}$

Por sua vez, o $\text{O}_2^{\cdot -}$ pode ainda sofrer uma reação de dismutação (figura 4; reação H, figura 7), catalizada pela superóxido dismutase, com produção de H_2O_2 , sendo este um importante mecanismo de detoxificação da célula⁸⁴.

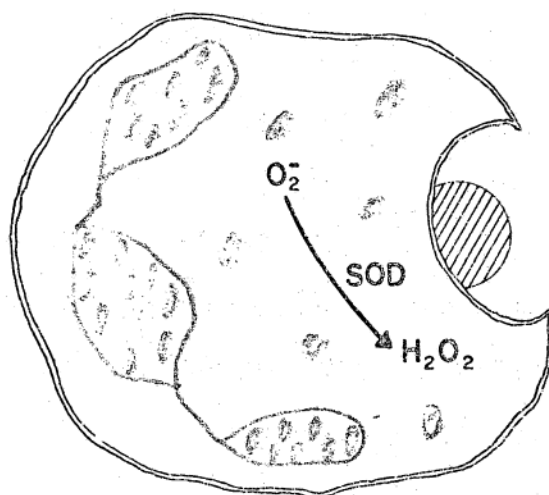


Fig. 4 - PRODUÇÃO DE H_2O_2 PELA DISMUTAÇÃO DO $\text{O}_2^{\cdot -}$

O radical OH^\bullet , altamente reativo, é também forte agente microbicida^{16, 84, 107, 139, 234, 272}. A sua formação, que pode ocorrer a partir da interação do O_2^- com o H_2O_2 , requer a participação intermediária de um metal para que, em condições fisiológicas, se processe em velocidade ótima. A formação de OH^\bullet é explicada assim mediante a reação de Fenton ou Harber-Weiss modificada, na qual o O_2^- reage inicialmente com uma forma oxidada de metal, levando à redução do metal e produção de O_2 . A forma reduzida do metal então reage com H_2O_2 , refazendo o metal oxidado e formando OH^\bullet e radical hidroxila (figura 5; reação I, figura 7).

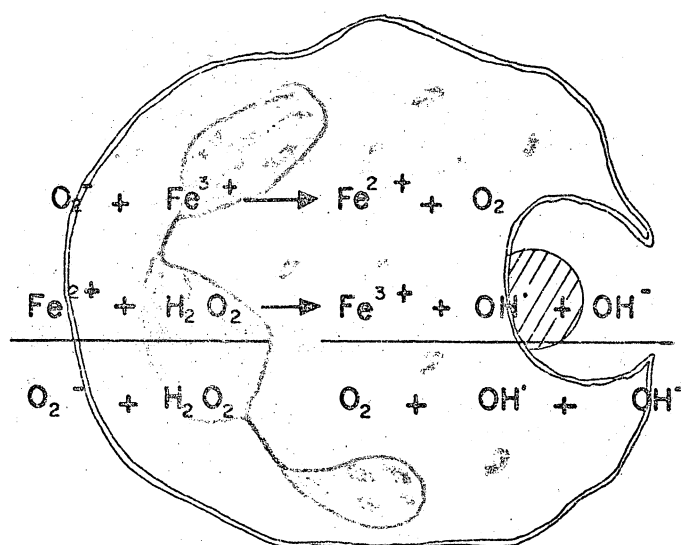


Fig. 5 - PRODUÇÃO DE RADICAL OH^\bullet

AMBRUSO & JOHNSTON demonstraram que a lactoferrina, proteína contendo ferro, presente nos grânulos específicos dos neutrófilos, pode facilitar a produção de radicais OH^\bullet , por sua habilidade em providenciar ferro como catalizador para a redução do H_2O_2 pelo O_2^- ⁷. BOXER et alii relataram defeito na atividade bactericida dos neutrófilos desprovidos desses grânulos específicos³⁶.

Todos os radicais citados, derivados da redução do oxigênio, são altamente tóxicos para a célula bacteriana. Além deles, a forma molecular do oxigênio atmosférico ("triplet")^{16, 84, 139} pode absorver uma quantidade significativa de energia, suficiente para promover a excitação de um de seus elétrons, alterando a sua posição na molécula e conseqüentemente as suas propriedades magnéticas, originando a forma de oxigênio conhecida como "singlet" ($^1\text{O}_2$) (reação J, figura 7). Esta é de grande instabilidade, o que lhe confere potente capacidade de reação, atuando sobre uma grande variedade de compostos com dupla ligação, dessa maneira infligindo dano letal nos sistemas biológicos com os quais entre em contacto.

Há muitas evidências de que uma "explosão respiratória" intacta e a produção de O_2^- e outros metabólitos são essenciais para a destruição dos microorganismos ingeridos pelas células fagocíticas. Evidências atuais sugerem que a base primária da atividade microbicida resulta da produção de H_2O_2 e metabólitos subseqüentes. O H_2O_2 tem, por si só, intensa atividade bactericida que é, contudo, potencializada na presença de MPO e um cofator, geralmente um halogênio, constituindo o sistema bactericida MPO- H_2O_2 -halogênio, descrito em 1967 por KLEBANOFF^{141, 142} (figura 6; reação L, figura 7).

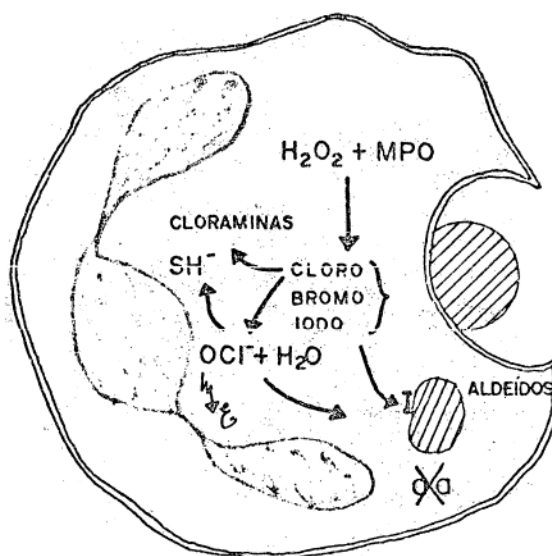


Fig. 6 - SISTEMA MPO - H₂O₂ - HALOGÊNIO.

Entre os cofatores que participam do sistema antimicrobiano, mediado pela mieloperoxidase, são citados o iodeto, brometo, cloreto, tiocianato, tiroxina e triiodotironina. O cloreto é o substrato mais fisiológico, já que é o mais abundante na célula¹³⁹.

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a destruição bacteriana pelo sistema MPO-H₂O₂-halogênio.

O H₂O₂ reage com o ferro dos grupos prostéticos da MPO para formar um complexo enzima-substrato, com capacidade oxidante. Os halogênios são oxidados por esse complexo, resultando na formação de fortes agentes antimicrobianos.

Quando iodeto é o cofator empregado, a morte do organismo é associada com a iodinação das proteínas bacterianas, particularmente a tirosina, além de resíduos histidina, resultando

na perda da integridade da superfície celular. Esse fato pode ser comprovado por técnica auto-radiográfica, que demonstra o iodo fixado na membrana bacteriana ^{139, 140}.

Quando o cloreto é utilizado, além da halogeneização da parede celular bacteriana, pode ocorrer a produção de uma forma altamente reativa, lembrando o ácido hipocloroso. Acredita-se, assim, que o mecanismo de ação do sistema antimicrobiano $\text{MPO} - \text{H}_2\text{O}_2 - \text{Cl}^-$, no vacúolo fagocítico seja análogo ao que ocorre nas piscinas, em que no meio é liberado um "cloreto ativado", numa forma similar, senão idêntica, ao ácido hipocloroso ¹⁶.

Esta forma ativada do cloreto poderia lesar o microorganismo de várias maneiras:

- a) por oxidação de grupos sulfidrila e conseqüente inibição de enzimas vitais ¹³⁹;
- b) pela oxidação do iodeto a iodo, levando a iodinação da parede celular bacteriana. Este mecanismo é evidenciado em estudos experimentais nos quais, em presença de baixas concentrações de iodo, a adição de cloreto estimula a iodinação da bactéria ¹³⁹;
- c) pela formação de cloraminas, resultantes de sua reação com compostos nitrogenados. As cloraminas podem ser microbicidas por toxicidade direta ao microorganismo ou por prolongar a atividade do sistema refe-

rido, servindo como forma de depósito de cloro, continuamente capaz de liberar cloreto ativado^{112,115}
139.

d) pela formação de oxigênio "singlet", resultante da reação do ácido hipocloroso com H_2O_2 , e conseqüente fornecimento de energia ao oxigênio molecular atmosférico. Este mecanismo constitui a hipótese mais recente utilizada para explicar a destruição bacteriana pelo sistema MPO- H_2O_2 -halogênio^{16,233}.

Outro mecanismo proposto baseia-se na demonstração por ZGLICZYNSKI et alii de que o sistema MPO pode causar deaminação e descarboxilação dos aminoácidos, com formação do aldeído correspondente. Tanto a degradação dos aminoácidos quanto a ação tóxica dos aldeídos poderiam lesar a bactéria^{268,293}.

Em resumo, e como KLEBANOFF salienta, o mecanismo de ação do sistema antimicrobiano mediado pela MPO não é simples, envolvendo um grande número de cofatores, cada qual com múltiplos modos de ação¹³⁹.

Outro sistema antimicrobiano tem sido descrito recentemente por KLEBANOFF (1982), no qual a MPO é substituída por Fe^{2+} , constituindo o sistema citotóxico Fe^{2+} -iodeto- H_2O_2 . A principal diferença entre os dois sistemas reside no fato de que no sistema MPO, esta enzima catalisa a oxidação de uma variedade de halogênios pelo H_2O_2 e a citotoxicidade é mediada pelos produtos formados. No sistema Fe^{2+} , o único halogênio e-

fetivo é o iodo e a atividade bactericida é dependente de $\text{OH}\cdot$
143

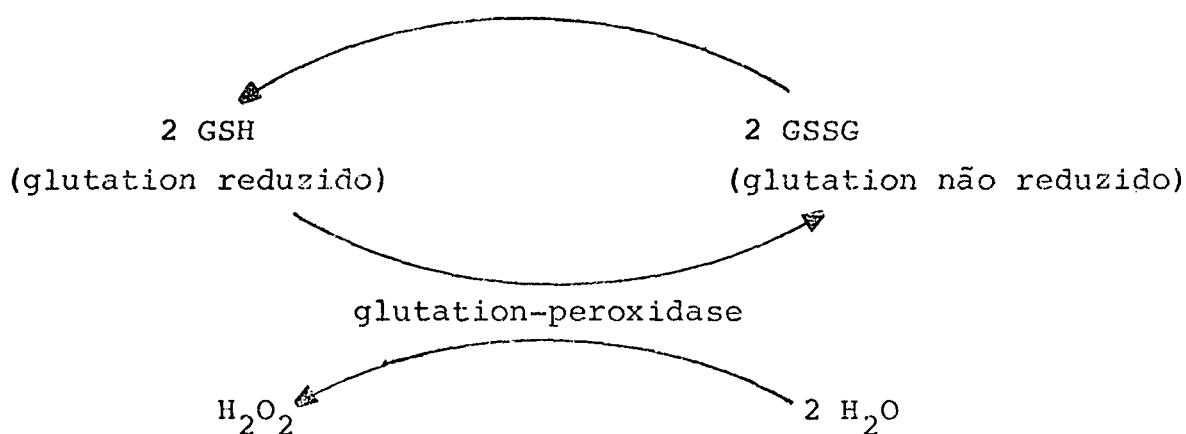
1.3.1. Mecanismos de detoxificação e proteção da célula

A ação tóxica dos radicais livres resultantes da redução do oxigênio, que visa primariamente a destruição bacteriana, pode também se fazer sentir sobre a célula e o meio ambiente celular²³⁸. Com a finalidade de evitar lesões do próprio hospedeiro, este apresenta mecanismos de detoxificação, a fim de remover os radicais citados do citoplasma, mecanismos estes que são dirigidos para a inativação do O_2^- e do H_2O_2 .

Os três principais sistemas enzimáticos envolvidos no processo de detoxificação celular são: superóxido dismutase, glutathion-peroxidase e catalase.

A enzima superóxido-dismutase vai agir sobre o superóxido, convertendo-o em H_2O_2 e O_2 ¹⁰⁹, enquanto que as outras duas enzimas citadas, glutathion-peroxidase e catalase, vão atuar sobre o H_2O_2 ¹³⁹.

A glutathion-peroxidase, enzima presente em concentrações significativas no citoplasma da célula, detoxifica H_2O_2 a H_2O , mediante a oxidação do glutathion reduzido (reação M, figura 7).



A catalase, por sua vez, é uma heme-enzima, citoplasmática, portanto dependente de ferro, que catalisa a redução divalente do H_2O_2 a H_2O (reação N, figura 7).

Além desses mecanismos que atuam diretamente sobre os metabólitos reativos tóxicos, outros protegem a célula por inativar o sistema formador de O_2^- . Um deles é a suposta destruição deste sistema pela ação da MPO. JANDL et alii demonstraram que neutrófilos estimulados em condições nas quais o sistema MPO esteve inativado, apresentaram um período maior de atividade do sistema formador de superóxido quando comparados com neutrófilos estimulados em condições nas quais a função da MPO esteve preservada¹²⁸.

O outro mecanismo de desativação da "explosão respiratória" envolve a internalização e degradação do sistema formador de O_2^- de tal modo que após 60 minutos do início desse processo, o consumo de O_2 e formação de O_2^- é semelhante ao da célula em repouso¹²⁸.

A Figura 7 representa esquematicamente os processos microbicidas e de detoxificação celular dos PMN.

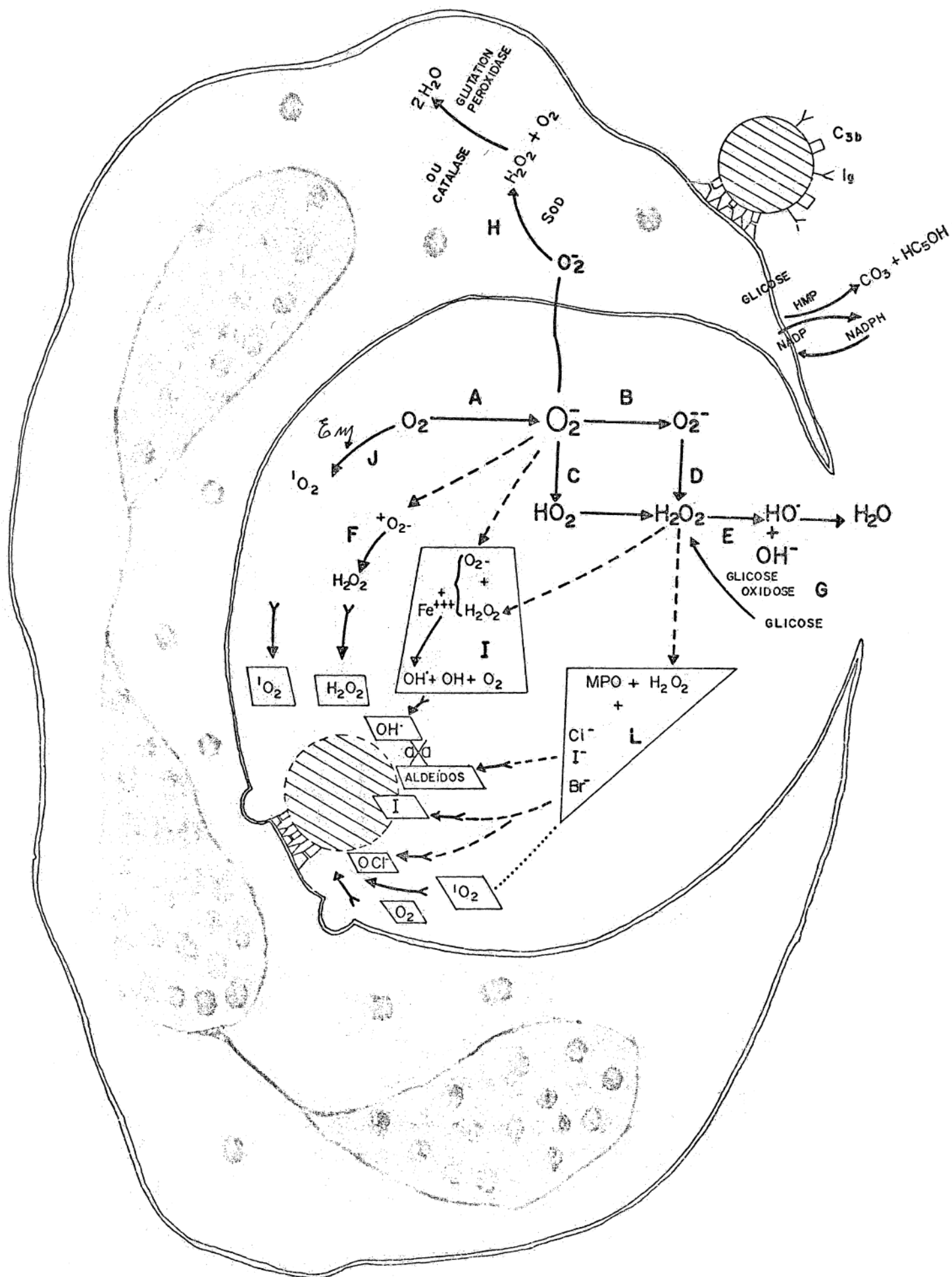


Fig. 7 -

REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS PROCESSOS MICROBICIDAS E DE DETOXIFICAÇÃO CELULAR DOS PMN.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Avaliar a função dos polimorfonucleares neutrófilos em crianças de 02 a 05 anos com anemia por deficiência de ferro, mediante análise de quimiotaxia, redução do NBT, poder bactericida e iodinação, antes e após a administração de ferro.

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

3.1.1. População de estudo

Pacientes - Este grupo foi formado por 30 crianças de ambos os sexos, com idade variando entre 02 e 05 anos, com anemia ferropriva, diagnosticada clínica e laboratorialmente, atendidas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, no Hospital Infantil Pequeno Príncipe, Hospital de Crianças César Pernetá, no Centro de Estudo, Diagnóstico e Indicação de Tratamento (CEDIT) e na creche Lar Escola Dr. José Leocádio Correia, no período de março de 1983 a março de 1984.

Critérios de inclusão

- . níveis de hemoglobina abaixo de 11 g/dl;
- . VCM \leq 73 fl;
- . HCM \leq 25 nng.

Controles - O grupo controle foi formado por 80 crianças com idade entre 02 e 05 anos, selecionadas na creche Lar Escola Dr. José Leocádio Correia, no CEDIT e nos ambulatórios de clínica cirúrgica pediátrica desta cidade.

Amostras de sangue dessas crianças foram obtidas por ocasião da colheita de material para realização de hemograma de rotina ou exames laboratoriais pré-operatórios. Dessa forma, foi realizado um mínimo de 20 ensaios para cada teste selecionado.

Critérios de inclusão

- . ausência de anemia.
- . $VCM \geq 73$ fl
- . $HCM \geq 25$ nng

Critérios de exclusão - Os seguintes critérios de exclusão foram utilizados, tanto para o grupo pacientes como para o grupo controle:

- . leucometria acima de 15.000/mm³;
- . hemoglobina abaixo de 4 g/dl;
- . eosinófilo $> 10\%$;
- . vigência de quadro febril ou manifestação de doença aguda;
- . antecedente de quadro infeccioso até duas semanas antes da realização dos exames;
- . ingestão recente de antibióticos ou antiinflamatórios;
- . transfusão sanguínea anterior;
- . peso abaixo do segundo desvio padrão negativo pela tabela de Marcondes (Classe IV - Santo André)²⁹²
- . história de atopia familiar.

3.2. MATERIAL

3.2.1. Equipamentos

- . Agitador Magnético METROHM Tipo E 349 A - Switzerland

- . Agitador Vortex-Genie - Modelo K-550-G
- . Agulhas descartáveis 30 x 8
- . Alça calibrada (0,001 ml) de platina
- . Antropômetro
- . Autoclave Soc. Fabbe Ltda - Mod 103 - SP - Brasil
- . Balança analítica Mettler H10
- . Balança Filizola
- . Banho-Maria - Soc. Eabbe Ltda. - SP - Brasil
- . Câmara de Neubauer
- . Câmara de Suta
- . Capela para gases tóxicos
- . Centrífuga Excelsa 2 - Modelo 205 N - Fanem Ltda - Indústria Brasileira
- . Centrífuga refrigerada automática - SORVALL RC - 3
- . Centrífuga internacional - tamanho 2 - modelo V - International Equipment Co. - Boston, Mass
- . Contador automático de células sangüíneas - Marca Coulter Counter - Modelo DN
- . Contador automático de células sangüíneas - Marca Coulter Counter - Modelo Ssr
- . Contador Gama - Modelo Logic 101 - Abbott

- . Discos de papel filtro medindo 80 mm de diâmetro
- . Dispositivo para produção de escavações na camada de agarose, para utilização na migração dos PMN. Esse dispositivo foi produzido artesanalmente baseado nas especificações de NELSON et alii. Compõe-se de duas séries de três projeções cilíndricas, de borda cortante, medindo 2,5 mm de diâmetro na margem externa e separadas entre si por igual distância. (Figura 10)
- . Erlenmeyer - 1000 ml
- . Espectrofotômetro Coleman Junior II modelo 6/20
- . Estufa modelo 061 - Fanem Ltda - SP - Brasil
- . "Freezer" (congelador Gelomatic) a temperatura de -20°C
- . Fita adesiva 3M Brasil
- . Homogeneizador Phoenix H522 - Ind. Brasileira
- . Microscópio eletrônico - Philips EM 300
- . Pipeta automática - Pipetman P - GILSON - Modelo P 200
- . Pipetas Pasteur - Fisher Scientific Company Pittsburg USA
- . Pipetas de vidro de 1,5 e 10 ml
- . Placas de petri descartáveis, 100 x 15 mm, de poliestireno - Lab-Tek Division, Miles Laborat
- . Placas de petri de vidro, com diâmetro de 200 mm

- . Radiometer Copenhagen Type PHM 28
- . Sacos de diálise - Sigma Chemical Company - St.Louis, USA
- . Seringas descartáveis de 20 ml e seringa de insulina
- . Seringas de precisão de 1 e 5 ul Hamilton - Hamilton Company, Reno Nevada, USA
- . Suporte de chumbo protetor para transporte de material radioativo
- . Tubos cônicos de plástico de 50 ml - Falcon
- . Tubos cônicos de vidro de 15 ml
- . Tubos de hemólise, com dimensão de 50 x 10 mm
- . Tubos de plástico descartáveis, com dimensão de 8 x 50 mm
- . Ultramicrotomo SORVAL MT 2B

3.2.2. Reagentes e Soluções

- . Acetona 100%
- . Ácido clorídrico 0,5 N
- . Ácido tricloroacético 10%
- . Agarose - HSC - 007-1760 - INLAB - SP - BR
- . Albumina bovina - Sigma Chemical Company - St. Louis, USA

- . Azul de Tripan 1% - Trypan blue - K & Laboratories, Inc, Plasmaview, New York, USA
- . Bicarbonato de sódio - Merck SA - Indústrias Químicas RJ - BR
- . Cacodilato 0,15 M
- . Corante de May-Grunwald - Giemsa
- . Dri-film - SC 87 - Pierce Chemical Company Illinois, USA
- . Etanol absoluto - Merck SA - Indústrias Químicas - RJ BR
- . Éter de petróleo - Merck Reagents
- . Estreptomicina
- . PBS - Fosfato salino tamponado - pH 7,2
 - fosfato dissódico (Na_2HPO_4) - 1,096 g
 - fosfato monossódico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) - 0,315 g
 - NaCl - 8,5 g
 - Água destilada qsp - 1000 ml
- . Gelatina
- . Gelose de conservação
 - extrato de carne - 2g
 - peptona - 4g
 - NaCl - 2g
 - Ágar - 4,4g
 - H_2O dest. qsp - 400ml
 - pH = 7,4

- . Glutaraldeído a 2%
- . Gradiente de Ficoll-Hypaque - Lymphocyte Separation Medium - Bionetic Laboratory Products - Kensington, MD, USA
- . Heparina - Liquevine Roche - 5000 UI de heparina/ml
- . Iodeto de sódio - I-131, sem redutor - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - SP - Brasil
- . Latex Beads - poliestireno - diâmetro de 0,8 micra - Sigma Chemical Company - St. Louis, USA
- . Macrodexin 6% em solução fisiológica - PM 70000 B.Brown Laboratórios
- . Meio Essencial Mínimo - MEM - com L-glutamina, (Eagle) Grand Island Biological Company New York, USA
- . Metanol para análise - Merck SA - Indústrias Químicas RJ - BR
- . Nitro Blue Tetrazolium - Sigma Chemical Company - St. Louis, USA
- . Penicilina cristalina
- . Piridina - Merck SA - Indústrias Químicas - RJ - BR
- . Pool de soro humano fresco, de no mínimo 3 a 5 doadores
- . Salina - solução de cloreto de sódio a 0,8g%

. Solução de cianeto de potássio 0,01 M

. Solução de formalina tamponada:

formalina 37-40%	- 100 ml
água destilada	- 900 ml
fosfato de sódio monobásico	- 4000 mg
fosfato de sódio dibásico (anidro)	- 6500 mg

. Solução de glicose 40 mM

. Solução de iodeto de sódio 2 mM

. Solução tampão-fosfato Krebs-Ringer sem cálcio; pH 7,4

NaCl 0,9% (0,154m)	- 1180 mg
KCl 1,15% (0,154m)	- 92 mg
KH_2PO_4 2,11% (0,154m)	- 42,2 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,8% (0,154m)	- 76 mg
H_2O destilada qsp	- 500 ml

. Solução tampão-fosfato, pH 7,2 para dialisar o látex:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	- 26,69 g/l	- 700 ml
KH_2PO_4	- 20,41 g/l	- 200 ml

. Soro AB inativado por 30 minutos a 56°C, obtido junto a doador no Banco de Sangue, sendo distribuído em alíquotas de 3 ml e mantido a -20°C.

. *Staphylococcus aureus* - cepa ATCC 25923

. Tampão cacodilato 0,3 M

. Tetróxido de ósmio a 1%

. Tiosulfato de sódio a 0,1 M

. Trypticase Soy Agar 11043 - BBL - Microbiology Systems
Becton Dickinson and Co. Cockeysville, MD

. Zymosan - Sigma Chemical Company - St.Louis,USA

3.3. MÉTODOS

Dados de identificação, história e exame físico foram obtidos pela autora, mediante formulário (anexo 1).

3.3.1. Obtenção do peso e estatura

As crianças tiveram seu peso e estatura obtidos mediante utilização de balança Filizola e antropômetro com régua fixa, da unidade em que estavam sendo atendidas. Os pesos e estaturas foram comparados com aqueles das tabelas de Marcondes-Santo André (Classe IV)..

3.3.2. Colheita do material

O material foi colhido no período de março de 1983 a março de 1984. Todas as amostras foram obtidas pela autora.

Por punção de veia periférica da prega cubital ou jugular externa, foram colhidos com seringa descartável, 25 ml de sangue, a seguir distribuídos da seguinte maneira:

- 2,5 ml no frasco A - contendo EDTA potássico;
- 2,5 ml no tubo de ensaio B, sem anticoagulante;

- 20 ml no tubo de plástico C, contendo 400 UI de heparina;
- esfregação de gota de sangue em lâmina de vidro medindo 2,5 x 7 cm, para análise microscópica e contagem específica dos leucócitos.

Do material do frasco A, foi realizado hemograma pelo sistema Coulter Ssr, e contagem de reticulócitos.

Do material do tubo B, foi obtido soro por repouso a temperatura ambiente por uma hora e posterior centrifugação a 2000 rpm, por 30 minutos. Esse soro foi estocado a -20°C, para a determinação de ferritina, por radioimunoensaio, utilizando "Kit Diagnostic".

Do material do tubo C, foram isolados PMN, para serem testados nas seguintes funções: quimiotaxia, redução do NBT, iodinação e poder bactericida.

Esses testes foram feitos por ocasião do diagnóstico e repetidos após três a sete dias de administração de ferro ao paciente.

3.3.3. Siliconização

Todo o material de vidro utilizado foi siliconizado para evitar a aderência dos polimorfonucleares à sua superfície.

O procedimento constituiu de imersão do material em uma solução a 10% de silicone DRI-FILM em éter de petróleo, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

Após, o material foi transferido para uma solução de etanol a 95%, por 5 minutos, e lavado com água deionizada por quatro vezes.

O material foi secado em estufa e posteriormente esterilizado em autoclave.

3.3.4. Opsonização das partículas de zymosan

As partículas de zymosan foram opsonizadas mediante incubação de 05 mg com 0,5 ml de pool de soro fresco humano, formado no mínimo por três soros, obtidos junto ao setor de coleta de exames de rotina do laboratório central do Hospital de Clínicas.

Após a incubação durante 30 minutos a 37°C, as partículas foram lavadas e ressuspensas em igual volume de PBS. O zymosan assim opsonizado foi utilizado para as técnicas de quimiotaxia e iodinação. As partículas foram opsonizadas imediatamente antes do uso.

3.3.5. Separação dos polimorfonucleares neutrófilos do sangue periférico

A obtenção dos polimorfonucleares seguiu a técnica descrita por Böyum, em 1968, modificada³⁷.

Vinte mililitros de sangue heparinizado foram diluídos com solução salina isotônica, em partes iguais. Essa mistura foi colocada em dois tubos cônicos, contendo 5 ml de ficoll-hypaque, $d = 1077$, e centrifugada por 30 minutos, a 300 xg.

A centrifugação sobre ficoll-hypaque resultou em uma camada superior de plasma rico em plaquetas, sobre um anel de mononucleares na interface. No fundo do tubo, sedimentaram-se eritrócitos e neutrófilos (figura 8).

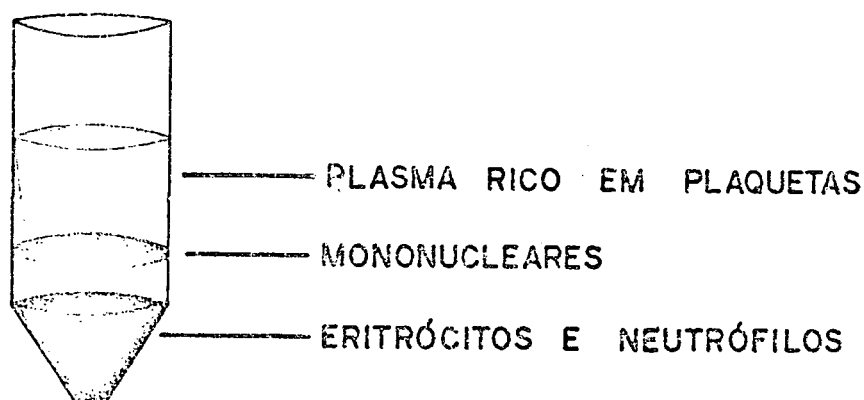


Fig. 8 - Localização esquemática das células sanguíneas após centrifugação sobre FICOLL - HYPaque $d = 1077$.

O sobrenadante, constituído de plasma e plaquetas, foi desprezado e as células da interface examinadas em lâminas preparadas em câmara de Suta, para verificar possível contaminação de neutrófilos.

O sedimento, formado por eritrócitos e neutrófilos, foi ressuspenso em 20 ml de uma mistura de dextran a 6% e salina, volumes iguais.

A mistura sangue-dextran foi agitada por inversão do tubo várias vezes até se obter suspensão homogênea, a fim de se conseguir uma boa separação dos eritrócitos. Os tubos foram mantidos inclinados, à temperatura ambiente, por 45 minutos, para sedimentação dos eritrócitos. A seguir, o sobrenadante, rico em PMN, foi lavado com 10 ml de uma solução de PBS, albumina a 0,5% e heparina 10 UI/ml, e centrifugado a 300 xg por 10 minutos.

Os eritrócitos remanescentes foram lisados com 5 ml de uma solução salina hipotônica a 0,2%, por 45 a 60 segundos, em agitação constante, reconstituindo-se imediatamente a isotonicidade, por se adicionar 5 ml de salina a 1,6%. Esse procedimento de lise hipotônica foi repetido.

Os PMN assim obtidos foram lavados com PBS e a sua concentração ajustada para $2,5 \times 10^7$ PMN/ml, com auxílio de um contador automático, modelo DN.

3.3.6. Quimiotaxia dos PMN sob agarose

A quimiotaxia dos neutrófilos foi avaliada pela técnica de Nelson et alii., modificada¹⁹³.

Preparo das placas de agarose - Sobre a lâmina de poliestireno, medindo 2,5 x 6 cm, cujas bordas foram levantadas por fita adesiva de maneira a formar uma câmara, foram colocados 4,5 ml de uma mistura de agarose 1%, preparada da seguinte maneira: trezentos miligramas de agarose foram dissol-

vidos em 13,5 ml de água destilada, por aquecimento, em ebulição, durante 10 a 15 minutos.

Após resfriamento, em banho-maria a 48°C, a agarose foi misturada com igual volume de MEM 2X, pré-aquecido, e suplementado com 3 ml de soro humano inativado, resultando numa concentração final de 10% de soro. Foram adicionados 375 ug de bicarbonato de sódio, 100 unidades de penicilina e 100 ug de estreptomicina por ml de meio total.

As placas foram colocadas a 4°C, por 30 minutos, para adquirirem consistência. Em seguida, duas séries de três escavações, medindo 2,5 mm de diâmetro, distantes 2,5 mm entre si, foram produzidas sobre a placa de agarose. As placas foram preparadas imediatamente antes do uso (Figuras 9 e 10).

Os PMN foram suspensos em MEM, numa concentração de $2,5 \times 10^7$ /ml. Dessa suspensão, foram colocados 10 ul na escavação central da série de três da placa de agarose.

Na escavação externa, foram colocados 10 ul de ZAS e a escavação interna recebeu 10 ul de um meio controle não quimiotático (MEM).

As placas foram incubadas a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ em ar.

Após duas horas de incubação, as células foram fixadas pela adição de 3 ml de metanol absoluto e incubadas por 15 ho-

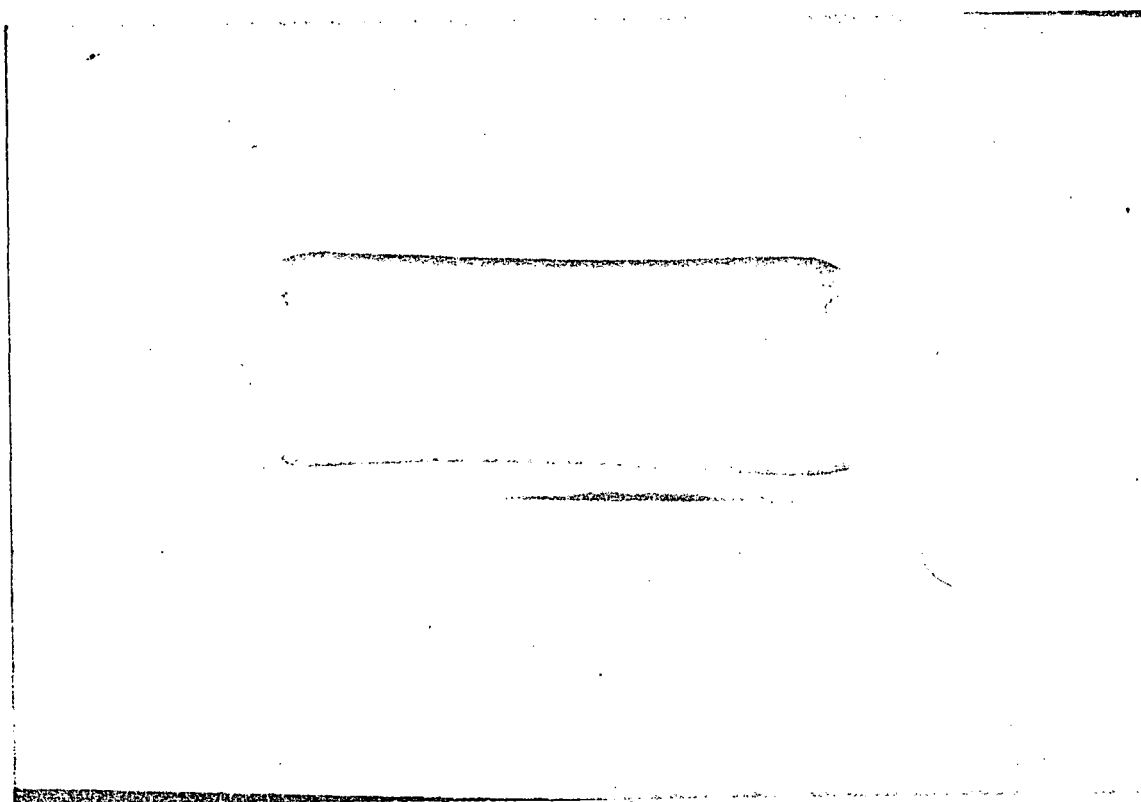


Figura 9 - Placa de agarose

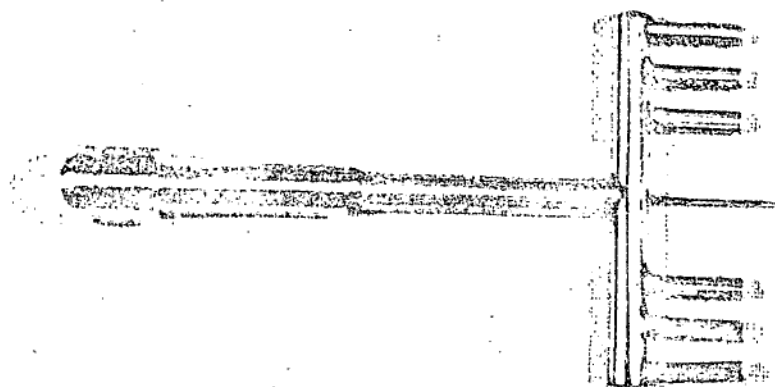
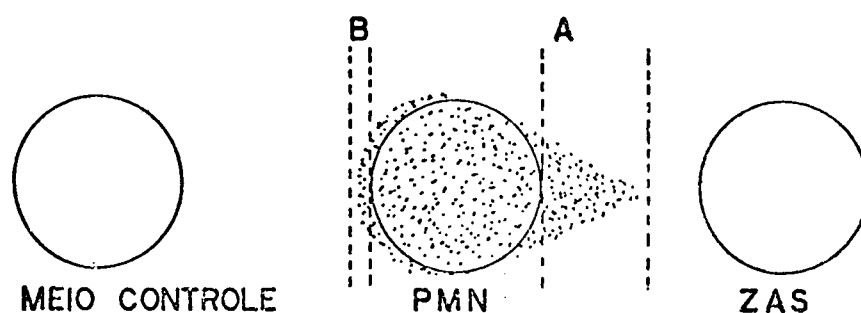


Figura 10 - Dispositivo padronizado para realização dos orifícios na placa de agarose

ras, a 49°C. A seguir, 3 ml de formalina tamponada a 47% foram adicionados e a placa novamente incubada por 30 minutos. Depois da fixação, o gel foi removido intacto e as lâminas coradas com corante May Grünwald - Giemsa.

A quantificação da migração foi feita medindo-se, em microscópio com objetiva de imersão, a distância linear percorrida pelas células a partir da margem da escavação central em direção ao fator quimiotático. Essa distância foi chamada de distância A; aquela percorrida pelas células em direção à escavação do meio controle, avaliada a partir da borda interna da escavação central, de distância B. (figura 11).

Fig. 11 - MIGRAÇÃO DOS PMN



O "índice quimiotático" foi obtido pela relação entre a distância A e a distância B, e o "diferencial quimiotático", pela subtração da distância B da distância A.

As figuras 12 e 13 mostram PMN em migração.

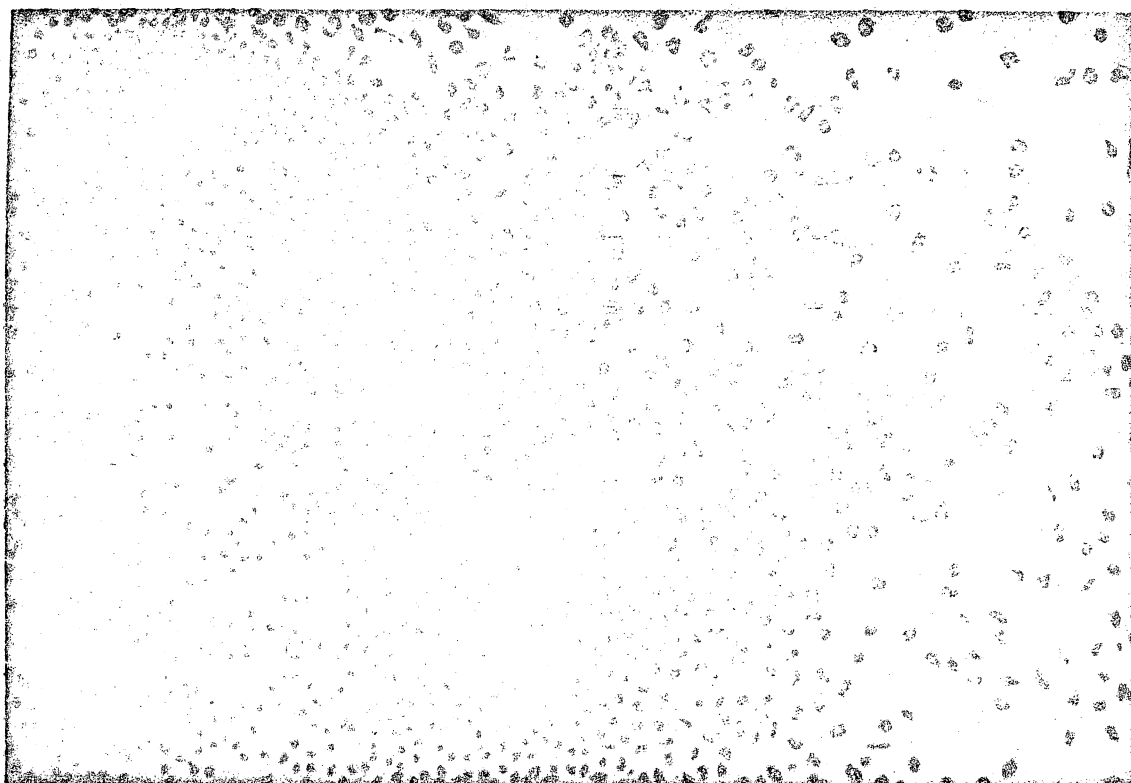


Figura 12 - PMN em quimiotaxia. A foto apresenta a migração dos neutrófilos a partir do orifício central em direção ao estímulo.

X 100

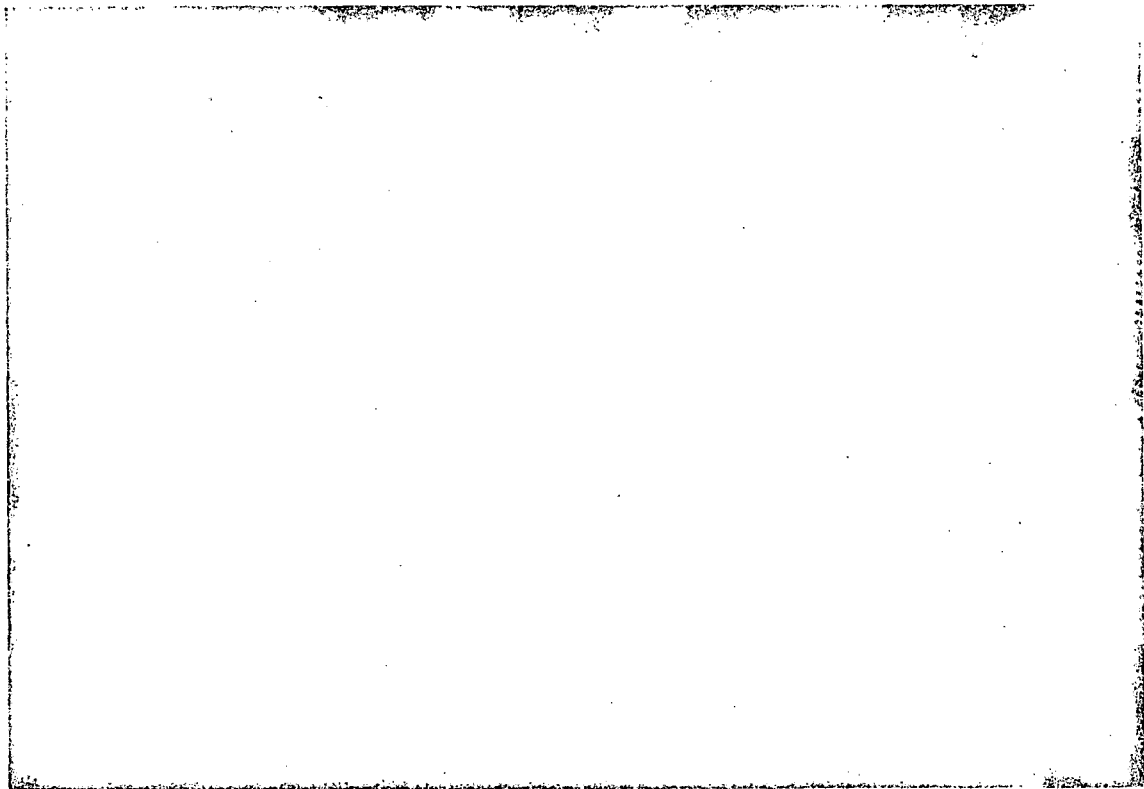


Figura 13 - PMN em quimiotaxia

X 1000

3.3.7. Teste da redução do "nitro blue tetrazolium"

Utilizamos a técnica da avaliação quantitativa da redução do "nitroblue tetrazolium", descrita por BAEHNER & NATHAN (1968),²³ e que consistiu dos passos a seguir descritos.

Preparo das partículas de látex - 0,2 mililitros da solução de partículas de látex, com 0,8 micra de diâmetro, foram dializados, durante 24 horas, em solução tampão fosfato, pH 7,2 a 4°C, por agitação constante. O látex foi recuperado num volume final de 1 ml da mesma solução, em tubo de ensaio graduado. Esse material foi estocado por um período máximo de 90 dias.

Em três tubos cônicos de vidro siliconizado foram acrescentados:

- a) 0,1 ml de solução de cianeto de potássio 0,01M;
- b) 0,4 ml de solução a 0,1 g% de NBT em salina 0,85g%.

No primeiro e segundo tubos, foram acrescentados 50 ul da solução de látex dializado. O volume final da mistura foi ajustado para 1,0 ml, com tampão Krebs-Ringer, sem cálcio.

Os dois primeiros tubos, que continham látex, foram designados *branco* e *ativado*, respectivamente, e o terceiro tubo, *repouso*.

A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos. A seguir, foi adicionado 0,1 ml da suspensão de polimorfonucleares ajustada à concentração de $2,5 \times 10^7$ PMN/ml, e novamente incubada a 37°C por 15 minutos.

A reação foi terminada com 10 ml de ácido clorídrico a 0,5 N. No tubo branco, o ácido foi colocado imediatamente após a suspensão de PMN.

Os tubos foram então centrifugados a 1000 xg, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e desprezado. Sobre o sedimento, foram colocados 2 ml de piridina, levando-se então ao banho fervente por 10 minutos, com a finalidade de se extrair o látex. Os tubos foram centrifugados a 500 xg por cinco minutos e uma segunda extração do látex, com 2 ml de piridina, foi repetida. Após centrifugação, os extratos foram misturados e a sua densidade óptica foi determinada num espectrofotômetro a 515 mμ contra um tubo branco de piridina (figura 14).

Os valores dos tubos em repouso (R) e ativado (A) pelo látex foram determinados e foi calculada a diferença (Δ d.o. por 15 minutos por $2,5 \times 10^6$ PMN) entre A e R.

3.3.8. Iodinização

A técnica de iodinação utilizada foi aquela descrita por PINCUS & KLEBANOFF²²⁰ e consistiu dos seguintes passos:

- a) em tubos de hemólise descartáveis, foram adicionados seqüencialmente:
 - . 200 nmoles de glicose;
 - . 40 nmoles de INa;
 - . 0,2 uCi de ^{131}INa ;
 - . 50 ul de zymosan opsonizado (ZAS) e,
 - . 5×10^6 PMN;

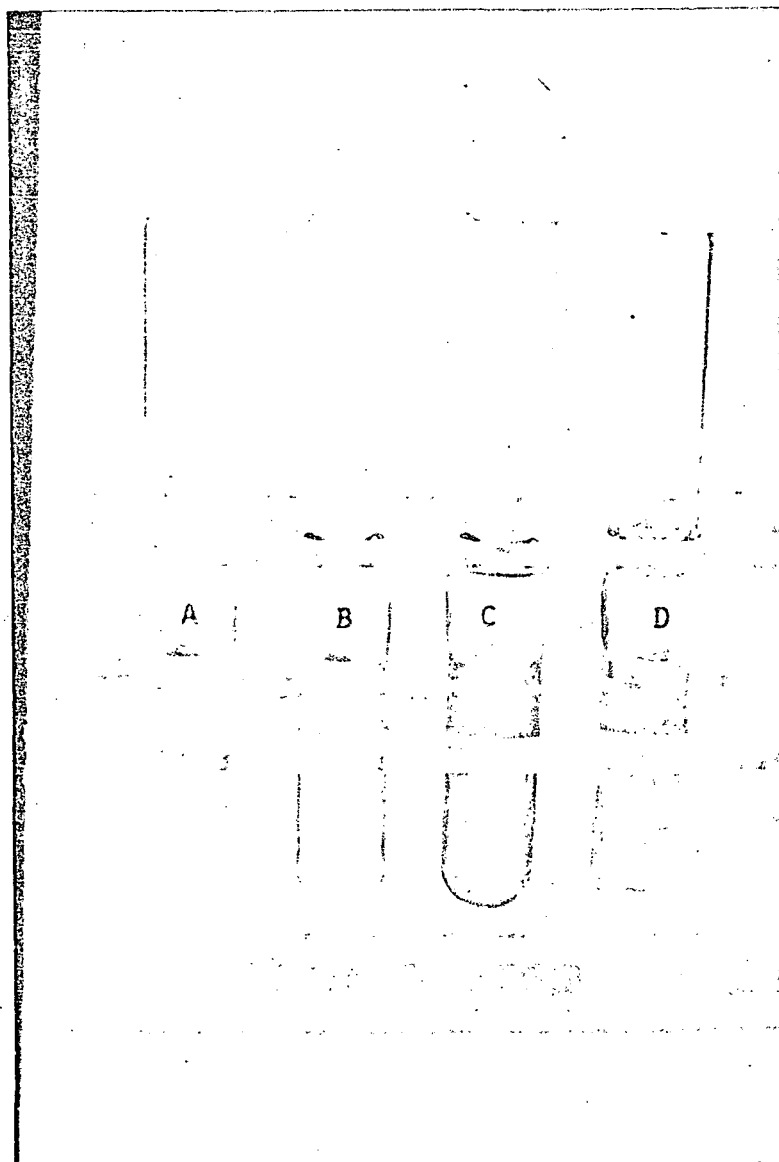


Figura 14 - Redução do NBT

A = Tubo branco com piridina

B = Redução do NBT, pelos PMN em repouso

C = Redução do NBT, pelos PMN ativados
para fagocitose

D = Solução de NBT a 0,1%

- b) o volume dessa mistura foi ajustado para 0,5 ml com tampão fosfato Krebs-Ringer, sem cálcio, pH 7,4;
- c) os tubos foram selados com "parafilm" e incubados por uma hora, a 37°C, em homogeneização constante.

A reação foi terminada aos 60 minutos, por adição de 0,1 ml de solução de tiosulfato de sódio 0,1 M; a seguir, adicionou-se 1 ml de TCA 10%, gelado, e o precipitado foi colhido por centrifugação a 2000 xg por 5 minutos e lavado quatro vezes com 1 ml de TCA 10%, gelado.

Os tubos testados foram então transportados em protetor de chumbo e lidos num contador gama Abbott. Os resultados foram expressos em nanomoles de iodeto, convertido à forma precipitável do ácido tricloroacético, por 10^7 PMN por hora, mediante a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm branco}}{\text{cpm total}} \times 40 \times 2$$

onde:

cpm = contagem por minuto

40 = número de nanomoles de INa frio adicionado à mistura.

2 = constante para se obter equivalência a 1×10^7 leucócitos por ml.

O manuseio do material radioativo foi realizado sob a supervisão do Serviço de Medicina Nuclear.

3.3.9. Poder bactericida dos PMN

Utilizamos a técnica de avaliação do poder bactericida descrita por KAPLAN et alii¹³⁴ modificada.

Preparo das bactérias - Cepa de *Staphylococcus aureus* com características biológicas previamente estabelecidas, cedida pela ATCC ("The American Type Culture Collection") obtida junto ao setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital de Clínicas, e utilizada em todo o estudo.

Essa bactéria foi mantida em gelose, sendo repicada semanalmente e semeada em tubos de ensaio, com gelose inclinada.

Antes do uso, as bactérias foram transferidas para um tubo contendo 5 ml de TSB e colocadas em estufa a 37°C, por um período de 18 horas. A seguir, essa suspensão de *Staphylococcus aureus*, assim cultivada, foi lavada duas vezes em água destilada e ajustada pelo fotocolorímetro a uma densidade óptica de 0,6 a 620mμ. Posteriormente, foi diluída em fosfato salino tamponado a 0,1% de gelatina, na proporção de 1:50, correspondendo a aproximadamente 3×10^7 bactérias/ml.

Em tubos de ensaio, foram adicionados, seqüencialmente:

- a) 0,1 ml da suspensão de *Staphylococcus aureus*;
- b) 0,4 ml de opsoninas, constituídas de pool de soro a 20% em PBS e
- c) 0,5 ml da suspensão de polimorfonucleares a uma concentração de 1×10^7 /ml.

A mistura foi levada a incubar durante 90 minutos a 37°C, em homogeneização constante.

Para cada indivíduo testado, foram preparados três tubos cujas reações foram interrompidas a zero (1 tubo) e 90 minutos (2 tubos).

No tempo desejado, os tubos foram centrifugados a 800 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 0,001 ml do sedimento foi transferido para um tubo de hemólise, contendo 1 ml de água destilada. Após obtida a lise dos leucócitos, 0,001 ml da suspensão foi semeado em placas de TSA. Estas foram incubadas a 37°C por 24 horas e o número de colônias contado manualmente.

3.3.10. Viabilidade dos neutrófilos

A viabilidade dos neutrófilos foi testada por exclusão mediante o uso do azul de Tripan a 1%, após a última reação ter sido cessada.

3.3.11. Administração terapêutica de ferro

Após o diagnóstico e realização das provas funcionais dos neutrófilos, foi prescrito sulfato ferroso na dose correspondente a 5 mg/kg/dia de ferro elementar.

Os testes foram repetidos após três a sete dias de tratamento.

3.3.12. Verificação da fagocitose à microscopia eletrônica

Para verificar a fagocitose das bactérias e zymosan nas condições em que foram realizadas as técnicas do poder bactericida e iodinação, separamos de alguns pacientes aos 10' de incubação, o conteúdo de um tubo para ser analisado à microscopia eletrônica.

O material obtido foi a seguir pré-fixado em glutaraldeído a 2% com tampão cacodilato 0,15 M. Após duas horas de fixação em glutaraldeído, o material foi lavado com tampão cacodilato por 15 minutos. Fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% com tampão cacodilato 0,30M. Em seguida, foi feita lavagem com solução de tampão cacodilato 0,15M e 0,2g NaCl durante 15 minutos, após o que foi contrastado com acetato de uranila a 2% por 24 horas. O material foi novamente lavado em água destilada durante 5 minutos e a desidratação realizada com etanol. Em seguida foi colocado em acetona a 100% e embebido numa mistura de Polylyte. Secções ultrafinas foram obtidas através do ultramicrotomo SORVAL MT 2B e coletadas em grades de cobre, coradas com citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico Philips EM 300.

As figuras 15 e 16 apresentam PMN contendo no seu interior bactérias ou zymosan.

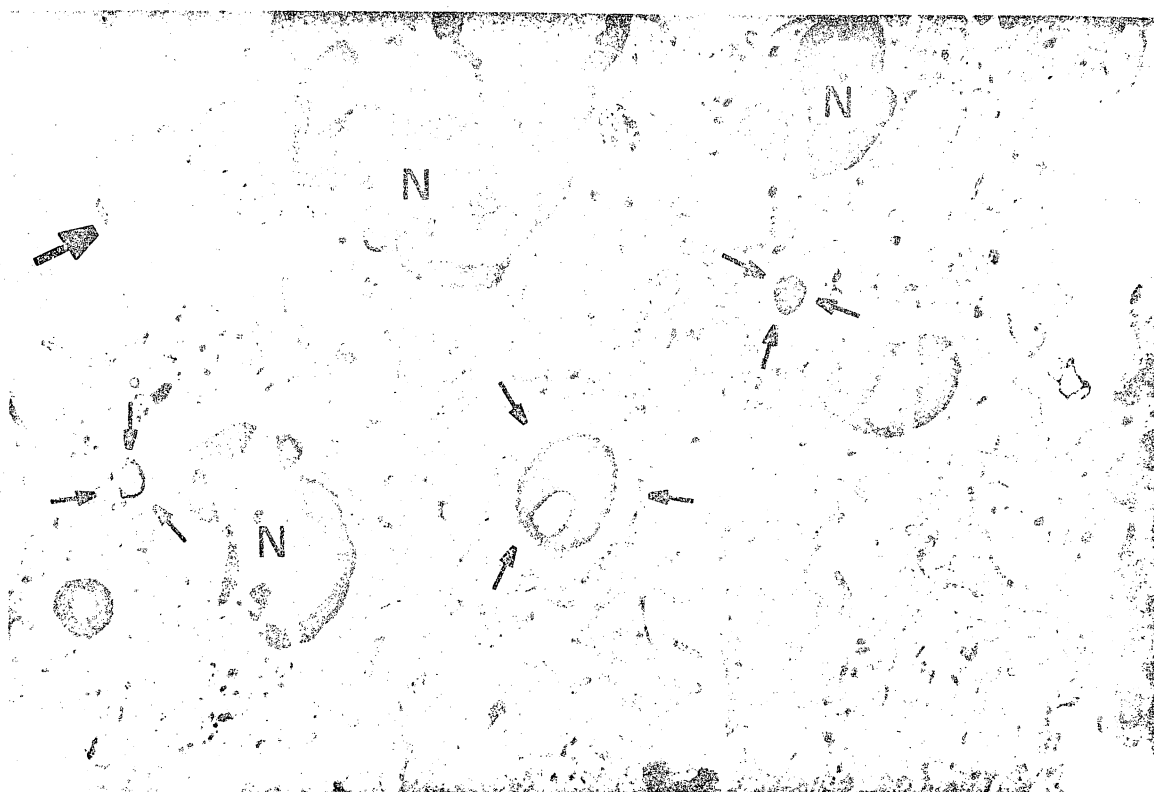


Figura 15 - Eletromicrografia mostrando PMN com núcleos (N) bem visíveis com cromatina (Cr) dispersa na periferia dos mesmos. O citoplasma dessas células é claro e apresenta numerosas expansões (seta). Dentro dele várias organelas são observadas. As setas finas indicam bactérias fagocitadas; aquela situada à esquerda já se encontra em desintegração. X 6500

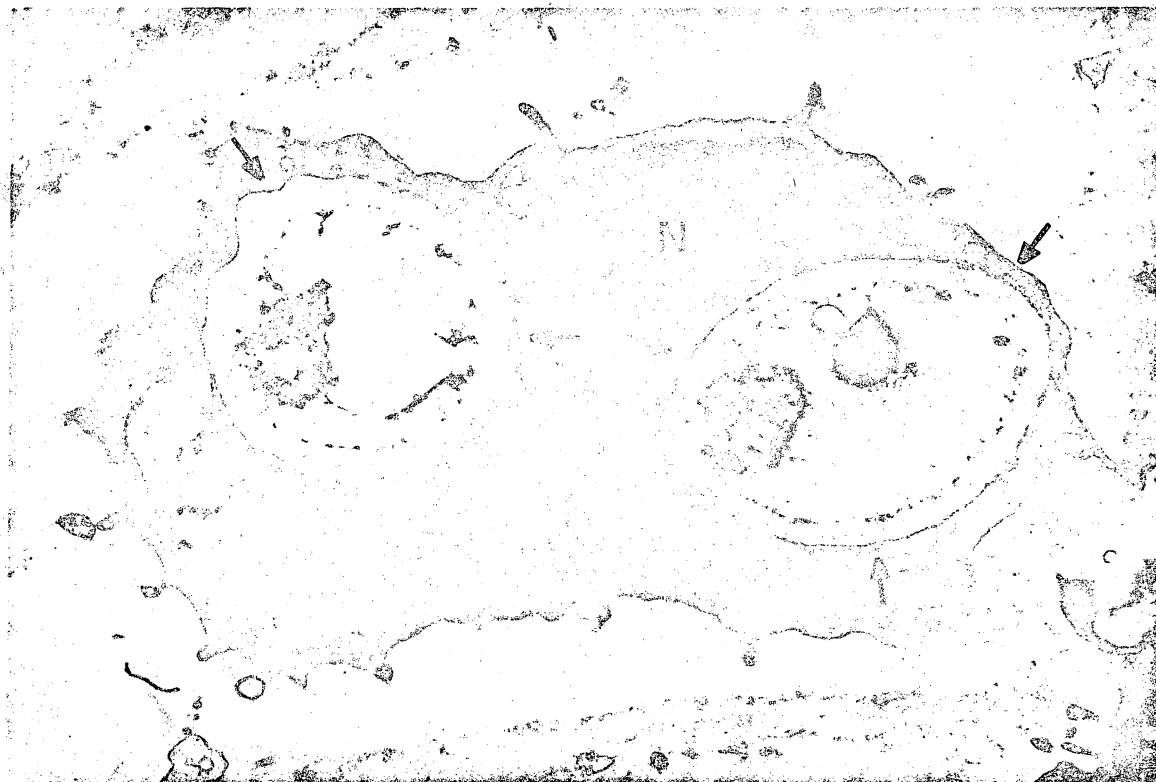


Figura 16 - Grande aumento de um PMN cujo corte atinge dois núcleos (N) em posições opostas. Estes também apresentam cromatina (Cr) na periferia. Neste corte ainda, são visualizadas duas estruturas fagocitadas que correspondem a zymosan (setas).

X 13500

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os dados de idade, identificação, sexo, cor e procedência dos controles e pacientes constam dos anexos II e III, respectivamente.

Para os controles, a relação sexo masculino : feminino foi de 1,05:1,00, a média de idade, de $4 \frac{3}{12}$ anos, com limites de variação de $2 \frac{2}{12}$ anos a $5 \frac{10}{12}$ anos.

Entre os pacientes, a relação sexo masculino : feminino foi de 3:1, a média de idade foi de $3 \frac{3}{12}$ anos, com limites de variação de 2 anos a $5 \frac{10}{12}$ anos.

Os dados de peso e estatura dos controles e pacientes constam dos anexos IV e V, respectivamente.

Todos os pacientes se situaram entre o -1,96 DP e o +1,96 DP para peso e estatura, havendo um predomínio discreto de pesos inferiores à média para os pacientes que para controles. A tabela 1 mostra a distribuição de pesos e estatura dos controles e pacientes, segundo o gráfico de desenvolvimento pôndero-estatural de Marcondes (Classe IV - Santo André).

TABELA 1 - Distribuição de pesos e estaturas dos controles e dos pacientes.

Situação em relação à média	Controles				Pacientes			
	Peso (%)		Estatura (%)		Peso (%)		Estatura (%)	
-1,96DP → -1,00DP	7	9	10	12	6	20	8	27
-1,00DP → M	42	52	35	44	15	50	11	36
M → +1,00DP	30	38	27	34	6	20	8	27
+1,00DP → +1,96DP	1	1	5	6	3	10	3	10
Acima do +1,96DP	-		3	4	-		-	
TOTAL	80	100	80	100	30	100	30	100

Os pacientes foram trazidos à consulta com a queixa principal de anemia, em 19 casos. A anemia foi queixa isolada em 13 desses pacientes, sendo acompanhada por astenia, irritabilidade ou geofagia em 6. Três pacientes apresentaram como único motivo de consulta, a queixa de geofagia. Em 2 pacientes, a anemia foi detectada em exame de triagem e em outro, por ocasião de exame clínico motivado por crise convulsiva (Tabela 2).

TABELA 2 - Queixas principais

Queixas	nº de pacientes	(%)
Anemia	13	44
Anemia e astenia	3	10
Anemia e irritabilidade	2	7
Anemia e geofagia	1	3
Geofagia	3	10
Astenia	1	3
Outros	7	23
TOTAL	30	100

Os anexos VI a VIII apresentam os valores hematimétricos dos controles e dos pacientes, ao diagnóstico e pós-tratamento, respectivamente.

Os parâmetros hematológicos e funcionais de PMN foram estudados utilizando-se a análise da variância para comparar os resultados do grupo controle com os do grupo de pacientes pré-tratamento. Para avaliar esses parâmetros, provenientes do grupo de pacientes pré e pós tratamento, consideramos como se os mesmos tivessem sido resultado de uma disposição em blocos aleatorizados, empregando-se o teste "t" de Student pareado e assim pressupondo homogeneidade das correlações das observações entre pacientes.

A tabela 3 mostra a média, desvio padrão e limites de variação dos valores hematimétricos. Considerando-se como dependente variável cada um desses valores, em relação ao grupo de pacientes pré-tratamento e o grupo controle, verificou-se que houve uma diferença estatisticamente significativa entre esses dois grupos, a nível de $\alpha = 0,0001$.

Os valores hematimétricos dos pacientes, pré e pós tratamento, também apresentaram diferença estatisticamente significativa, com exceção da variável CHCM, que mostrou níveis similares para os dois grupos.

TABELA 3 - Valores hematimétricos dos controles e dos pacientes, pré e pós tratamento.

	Nº	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (nng/dl)	CHCM (g/dl)
		$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$	$\bar{x} \pm sd$
		lim.var.	lim.var.	lim.var.	lim.var.
Controle	80	13,1 \pm 0,97 (11,4 a 15,5)	79,5 \pm 3,8 (73 a 89)	26,8 \pm 1,4 (24,5 a 29,9)	33,9 \pm 1,0 (31 a 36,8)
Pacientes	30	8,3 \pm 1,8 (4,2 a 10,9)	58,6 \pm 6,9 (47 a 70)	18,1 \pm 3,4 (13 a 24,7)	30,6 \pm 2,92 (24 a 38,1)
Pré					
Pacientes	30	9,0 \pm 1,8 (4,9 a 12,0)	61,2 \pm 3,1 (53 a 72)	19,1 \pm 3,1 (13 a 25,3)	30,9 \pm 2,7 (24,2 a 36,4)
Pós					
* Valor F		321,31	402,28	359,29	76,05
PR > F		0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
** T Student		5,65	6,78	3,62	0,62
PR > T		0,0001	0,0001	0,0011	0,5396

A contagem de reticulócitos dos pacientes,pré-tratamento, apresentou média de 0,7 com desvio padrão de \pm 0,7. Após o tratamento, a média foi de 2,3 e o desvio padrão de \pm 1,4. Esses valores foram significativamente diferentes a nível de $\alpha = 0,0001$

Os valores referentes ao número de leucócitos e à contagem leucocitária diferencial, para os controles e pacientes, são apresentados nos anexos IX e X, respectivamente.

Os níveis séricos de ferritina são apresentados nos anexos XI e XII.

A tabela 4 apresenta a média, desvio padrão e limites de variação desses resultados. Os grupos apresentaram médias significativamente diferentes, a nível de $\alpha = 0,0001$.

TABELA 4 - Níveis séricos de ferritina dos controles e pacientes.

	Nº	Níveis séricos de ferritina (ng/dl)		
		\bar{x}	sd	limites de variação
Controles	78	41,08	$\pm 44,97$	2,0 a 310
Pacientes	30	9,07	$\pm 14,17$	2,0 a 66

* Valor F 72,31

PR > F 0,0001

Nos anexos XIII e XIV, são apresentados os resultados de migração dos PMN, para controles e pacientes, compreendendo migração ao acaso, quimiotaxia, diferencial quimiotático e índice quimiotático.

A tabela 5 mostra a média, desvio padrão e limites de variação desses valores. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A distribuição dos resultados, utilizando a variável diferencial quimiotático, pode ser visualizada na figura 17.

MIGRAÇÃO DOS PMN

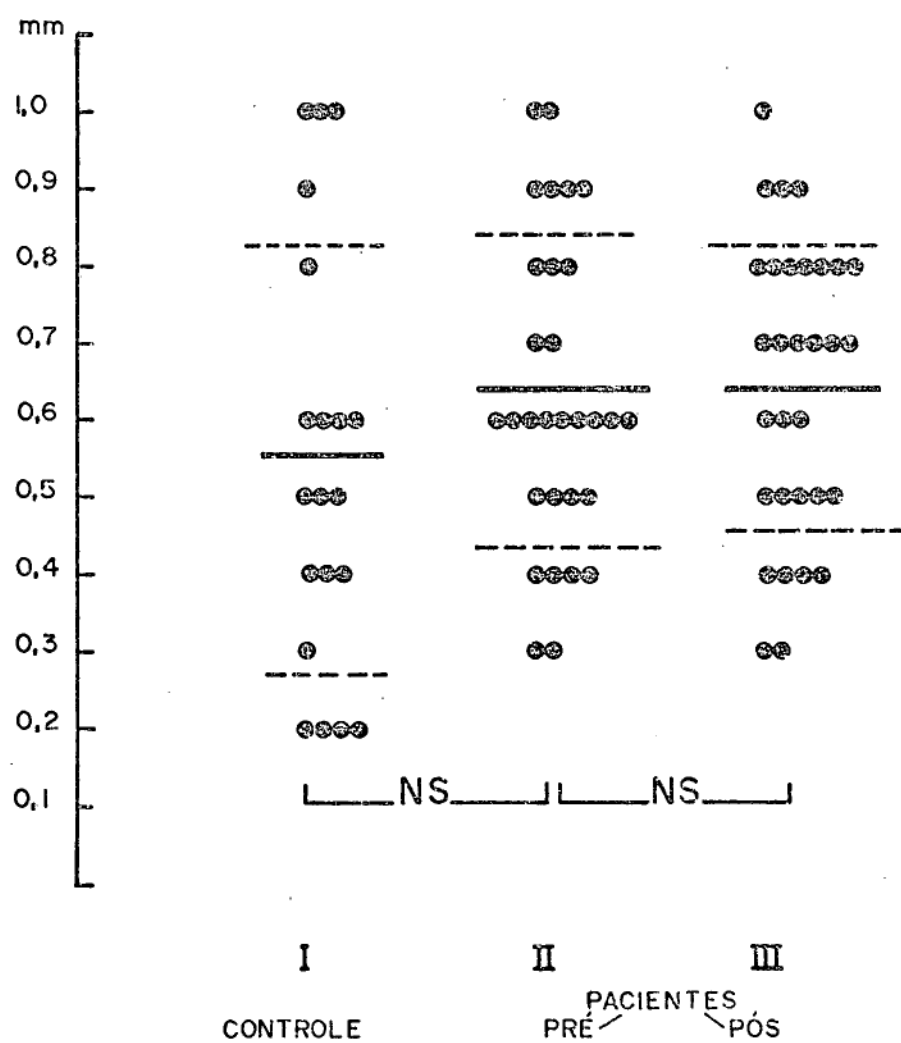


Fig. 17 - Resultados da migração dos PMN dos controles e dos pacientes pré e pós tratamento, dados em diferencial quimiotático (mm).

TABELA 5 - Resultados de migração dos PMN, para os controles e pacientes, pré e pós tratamento, em mm.

	nº	Quimiotaxia	Migração ao acaso	Diferencial quimiotático	Índice qui- miotático.
		$\bar{x} \pm sd$ lim.variação	$\bar{x} \pm sd$ lim.variação	$\bar{x} \pm sd$ lim.variação	$\bar{x} \pm sd$ lim.variação
Controles	20	$0,73 \pm 0,71$ (0,3 a 1,3)	$0,18 \pm 0,40$ (0,1 a 0,4)	$0,54 \pm 0,27$ (0,2 a 1,0)	$4,40 \pm 1,64$ (2 a 7) *
Pacientes pré tratamento	30	$0,84 \pm 0,24$ (0,40 a 1,20)	$0,20 \pm 0,08$ (0,1 a 0,4)	$0,63 \pm 0,20$ (0,20 a 0,3)	$4,37 \pm 1,34$ (2,3 a 7) **
Pacientes pós tratamento	30	$0,83 \pm 0,21$ (0,4 a 1,2)	$0,19 \pm 0,06$ (0,10 a 0,3)	$0,64 \pm 0,18$ (0,3 a 1,0)	$4,54 \pm 1,45$ (3 a 9)
* Valor F		3,05	1,19	2,86	0,06
PR > F		0,0876	0,2812	0,0978	0,8060
** T Student		-0,45	-1,28	0,15	0,56
PR > T		0,66	0,21	0,88	0,62

Dos anexos XV e XVI constam os resultados de redução do NBT, em repouso (R) e sob estímulo (A) por partículas de látex, para os PMN dos controles e pacientes, respectivamente. A diferença de densidade óptica (A-R) entre esses valores é apresentada nos referidos anexos.

Na tabela 6 são apresentados a média, desvio padrão e limites de variação desses resultados. Os valores para os grupos controles e de pacientes pré-tratamento diferiram significativamente, tanto para NBT em repouso ($\alpha = 0,0006$) quanto para a redução do NBT, sob estímulo ($\alpha = 0,006$), porém não se constatou diferença entre esses valores para os grupos de pacientes pré e pós tratamento.

TABELA 6 - Resultados de redução do NBT, pelos PMN dos controles e dos pacientes, pré e pós tratamento, em densidade óptica.

	nº	Repouso (R)	Ativado (A)	Diferença A-R
		$\bar{x} \pm sd$ lim.variação	$\bar{x} \pm sd$ lim.variação	$\bar{x} \pm sd$ lim.variação
Controles	20	$0,1028 \pm 0,046$ (0,04 a 0,201)	$0,2362 \pm 0,0826$ (0,110 a 0,390)	$0,1334 \pm 0,759$ (0,0400 a 0,335)
				*
Pacientes pré tratamento	30	$0,0623 \pm 0,0326$ (0,025 a 0,1600)	$0,1755 \pm 0,0634$ (0,088 a 0,3000)	$0,1117 \pm 0,0585$ (0,0400 a 0,2600)
				**
Pacientes pós tratamento	30	$0,0705 \pm 0,0360$ (0,0300 a 0,1700)	$0,1825 \pm 0,0675$ (0,095 a 0,320)	$0,112 \pm 0,0557$ (0,050 a 0,280)
<hr/>				
* Valor F		13,53	8,40	1,25
PR > F		0,0006	0,0057	0,2696
** T Student		1,95	1,46	0,11
PR > T		0,0697	0,1561	0,9095

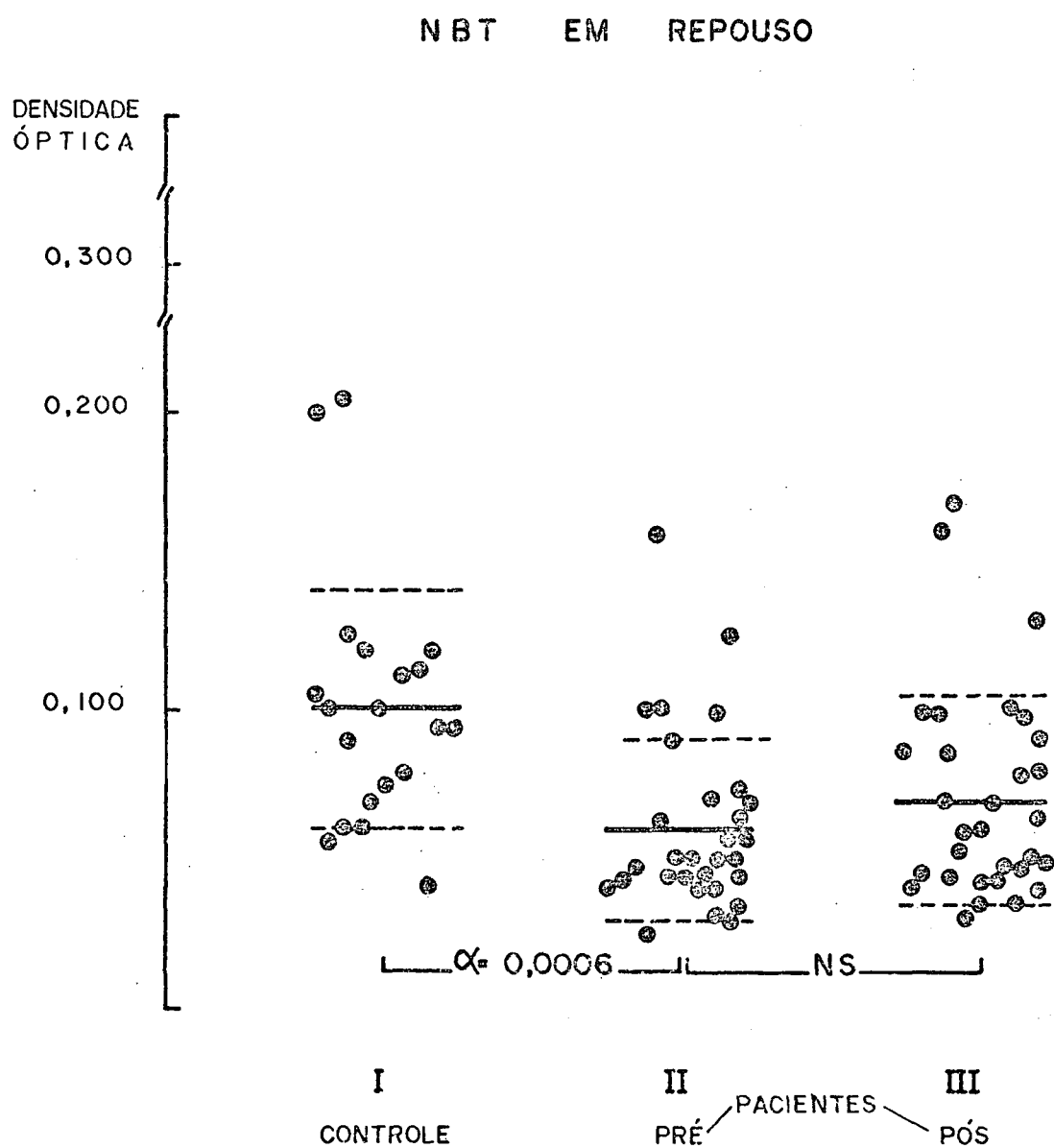


Fig. 18 - Resultados da redução do NBT pelos PMN em repouso dos controles e dos pacientes pré e pós tratamento, em densidade óptica.

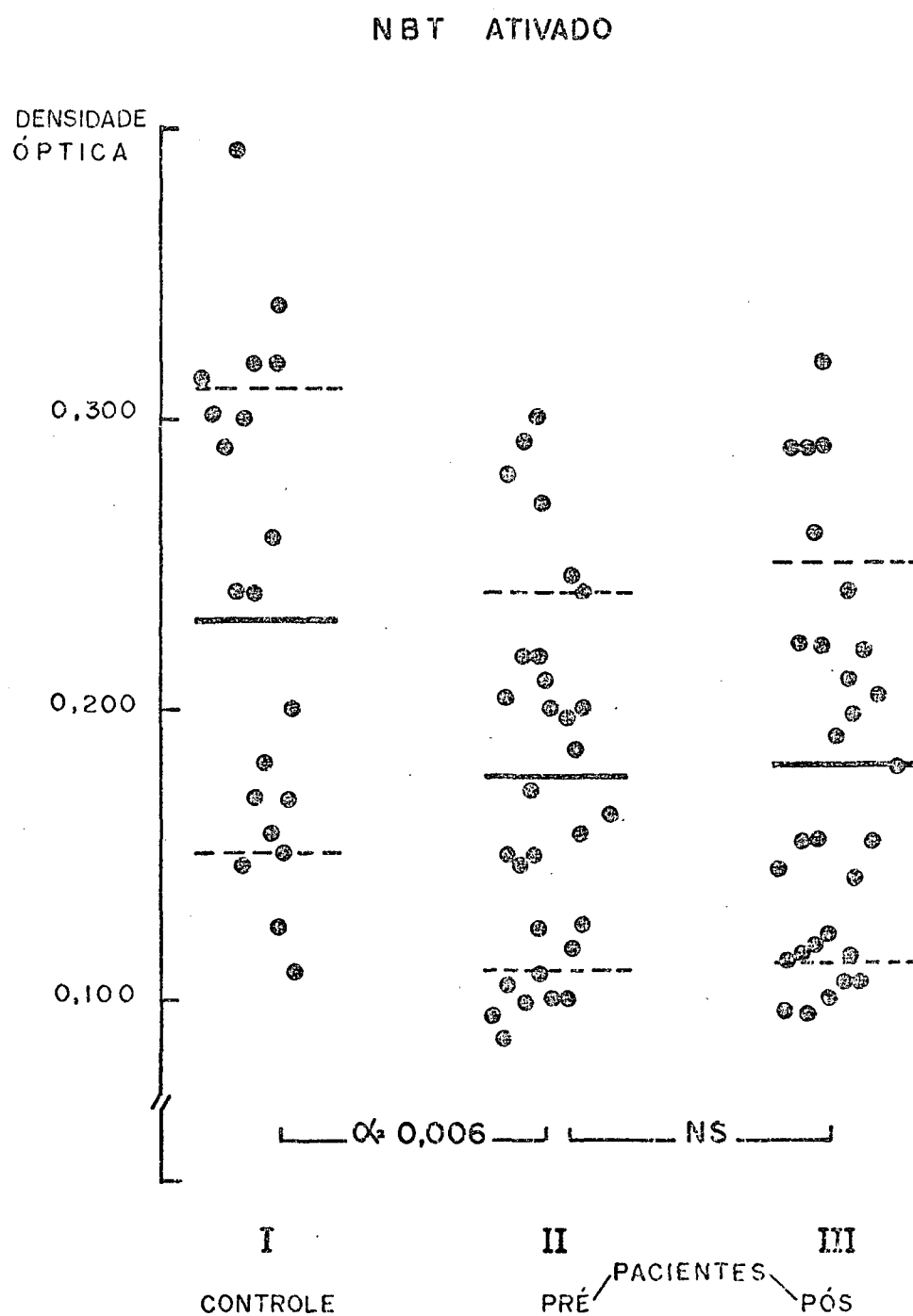


Fig. 19 - Resultados da redução do NBT pelos PMN, ativados pelo látex, para os controles e pacientes pré e pós tratamento, em densidade óptica.

As figuras 18 e 19 ilustram os resultados da redução do NBT.

A apresentação dos resultados de iodinação pelos PMN dos controles e dos pacientes é feita no anexo XVII. A tabela 7 mostra a média, desvio padrão e limites de variação desses valores. Houve diferença estatisticamente significativa com $\alpha = 0,003$ entre os resultados do grupo controle e os do grupo de pacientes pré tratamento. A diferença foi também significativa entre os resultados do grupo de pacientes antes e após o tratamento, com $\alpha = 0,0002$.

TABELA 7 - Resultados de iodinação pelos PMN dos pacientes, pré e pós tratamento, em nanomoles de $^{131}\text{INa}/10^7\text{PMN/hora}$

	nº	Iodinação
Controles	40	3,54 \pm 0,94 (2,12 a 5,58) *
Pacientes pré tratamento	30	2,84 \pm 1,01 (1,01 a 4,88) **
Pacientes pós tratamento	30	3,76 \pm 1,23 (1,75 a 6,44)
* Valor F		9,52
PR > F		0,0030
** T Student		4,22
PR > T		0,0002

Graficamente, esses resultados são apresentados na figura 20.

Os valores obtidos para o poder bactericida dos PMN, expressos em nº de colônias de *Staphylococcus aureus* viáveis no tempo zero do experimento e aos 90 minutos, podem ser vistos nos anexos XVIII e XIX e a verificação das diferenças entre os grupos, na tabela 8.

Com a finalidade de fornecer a esses resultados uma distribuição aparentemente normal, eles foram submetidos à seguinte transformação:

$$D = \arcsen \left(\sqrt{p} \right)$$

onde:

p = proporção de bactérias sobreviventes aos
90 minutos.

Os resultados diferiram significativamente entre o grupo controle e o de pacientes pré tratamento, a nível de $\alpha = 0,0022$; quando comparamos os resultados do grupo de pacientes pré e pós tratamento, a diferença não foi significativa.

IODINIZAÇÃO

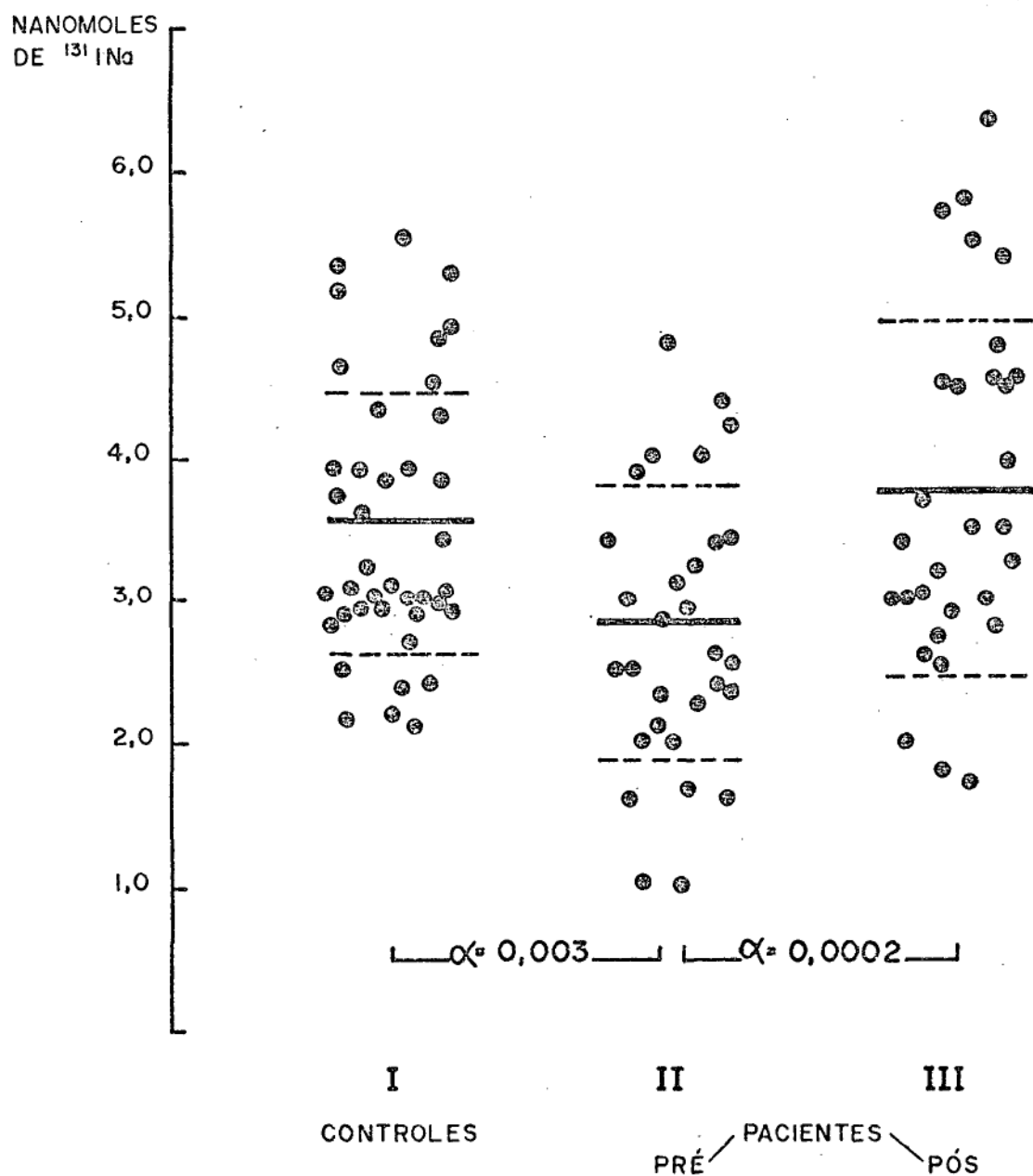


Fig. 20 - Resultados da iodinação pelos PMN dos controles e dos pacientes, pré e pós tratamento em nanomoles de $^{131}\text{I Na} / 10^7\text{PMN} / \text{hora}$.

TABELA 8 - Resultados do poder bactericida dos PMN dos controles e pacientes, pré e pós tratamento.

nº	nº de colônias de <i>Staphylococcus aureus</i>		
	tempo zero	90 minutos	D
Controles 20	1790,0 \pm 103,9 (1594 a 1920)	186,3 \pm 51,1 (120 a 321)	0,3263 \pm 0,0463 (0,2683 a 0,4381) *
Pacientes pré tratamento	1838,3 \pm 110,6 (1600 a 2020)	269,0 \pm 96,9 (120 a 480)	0,3871 \pm 0,0723 (0,2590 a 0,5408) **
Pacientes pós tratamento	1836,5 \pm 136,8 (1560 a 2090)	250,6 \pm 100,5 (95 a 460)	0,3699 \pm 0,0705 (0,2454 a 0,4883)
* Valor F			10,51
PR > F			0,0022
** T Student			-1,78
PR > T			0,0862

A figura 21 ilustra a distribuição dos valores citados.

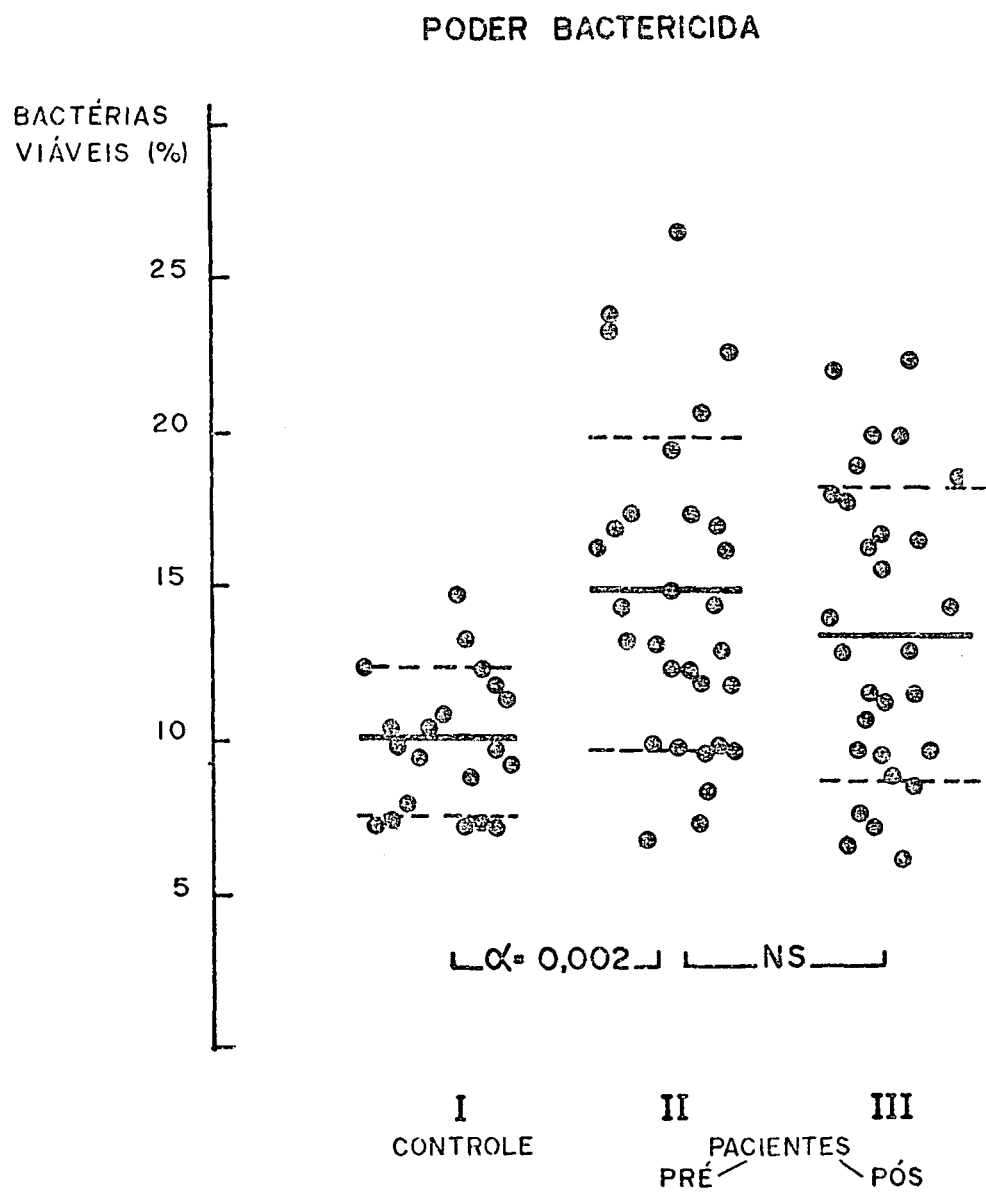


Fig. 21 - Resultados do poder bactericida dos PMN dos controles e dos pacientes pré e pós tratamento, em percentagem de bactérias viáveis aos 90'

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. FORMAÇÃO DOS GRUPOS

5.1.1. Idade

Selecionamos a faixa etária de 02 a 05 anos, por ser um período no qual existe homogeneidade daquelas funções dos PMN, cujos valores aumentam gradativamente com a idade, até um valor máximo observado no adulto ^{11,145}.

5.1.2. Caracterização da Anemia por Deficiência de Ferro

Considera-se como deficiência de ferro, aquela situação em que o suprimento férrico é inadequado para a síntese normal de compostos formados por esse metal ⁷⁵. A sua caracterização laboratorial pode ser feita mediante a avaliação de determinados parâmetros representativos do metabolismo do ferro, tais como informações obtidas a partir do sangue, medula óssea ou fígado.

O critério mais utilizado para avaliação da situação de repleção de ferro do organismo é a determinação dos níveis de hemoglobina ⁴⁹, pela efetividade, facilidade e baixo custo que a caracterizam.

No nosso estudo, consideramos como anêmicos, os pacientes com hemoglobina abaixo de 11 g/dl, valor esse considerado anormal para crianças da faixa etária selecionada para o presente trabalho ^{44, 75}.

Entretanto, a quantidade de hemoglobina produzida pode ser limitada também por outras deficiências nutricionais, de tal maneira que se faz necessária a caracterização de outros parâmetros para o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro.

Tradicionalmente, esse diagnóstico tem se baseado na determinação de ferro sérico, capacidade de transporte e índice de saturação da transferrina. DALLMAN et alii ⁷⁵ verificaram que, em crianças de 02 a 06 anos, o ferro sérico abaixo de 45ug/dl a capacidade de transporte > 300 ug/dl e o índice de saturação da transferrina abaixo de 10% permitem estabelecer o diagnóstico de deficiência de ferro.

Contudo, a determinação do ferro sérico possui limitações metodológicas para sua realização e interpretação; esse fato decorre de que quase todo o ferro sérico está ligado à transferrina e representa 0,1% do ferro total corporal. Cerca da metade da transferrina está no plasma e o restante circula pelo fluido extravascular. Assim, o ferro medido no plasma é uma avaliação estática de um processo dinâmico e não corresponde à quantidade total do ferro circulante, de tal maneira que, mesmo quando se obtém valores reduzidos de ferro plasmático, a sua utilização pela medula óssea pode estar sendo normal, dependendo do fluxo desse metal ^{44, 49, 88}.

Variações intra-individuais de até 20% em 10 minutos podem ser encontradas, no nível de ferro sérico, prejudicando a interpretação de um valor isolado ⁴⁹. Além disso, apresenta variação diurna, usualmente com níveis mais altos pela manhã ⁷⁵.

Problemas adicionais na valorização do nível de ferro sérico decorrem de dificuldades técnicas na liberação do ferro da transferrina, contaminação com ferro da hemoglobina porventura presente no soro e fácil contaminação com ferro de reagentes e instrumentos usados na sua determinação ⁴⁹.

A avaliação da concentração da transferrina no soro, ou seja, da capacidade de transporte, apresenta também inconvenientes técnicos como a possibilidade de contaminação com ferro ambiental e a difícil execução.

O índice de saturação da transferrina, obtido pela divisão da concentração de ferro sérico pela capacidade de transporte, multiplicado por 100, está sujeito às mesmas restrições - tanto do ponto de vista técnico quanto da dificuldade de interpretação - aplicadas aos parâmetros pelos quais é determinado. Assim, verifica-se uma ampla faixa de superposição de valores normais com aqueles indicativos da deficiência de ferro ⁷⁵.

Quando o procedimento técnico para estimativa desses parâmetros é automatizado, os valores obtidos são mais precisos, contudo, quando a sua determinação é feita manualmente, a confiabilidade nos resultados se torna reduzida. Considerando as dificuldades acima enumeradas e o grande volume de sangue ne-

cessário, optamos por não realizar as determinações de ferro sérico, capacidade de transporte e índice de saturação.

Outros parâmetros que podem ser utilizados para a caracterização da anemia por deficiência de ferro são os índices celulares. Até há alguns anos atrás, a determinação do volume corpuscular médio (VCM), era feita de maneira tecnicamente precária, dependendo da relação entre o hematócrito e o número de eritrócitos contados através de microscópio, assim sujeita a variações de volume plasmático e de observações individuais. Com o advento dos contadores eletrônicos, o volume de eritrócito passou a ser determinado com precisão⁷⁵. A associação de anemia com VCM baixo é bastante indicativa da deficiência de ferro, mas é também encontrada na talassemia menor, devendo este diagnóstico diferencial ser considerado principalmente nas populações em que é alta a sua incidência^{49,75}.

A deficiente hemoglobinizacão do eritrócito, observada na anemia ferropriva, pode ser também utilizada na sua caracterização diagnóstica, mediante o índice da hemoglobina corpuscular média (HCM), que é obtido pela relação entre a concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos contados⁴⁹.

HERSHKO et alii estudaram 294 crianças de ambos os sexos, com o objetivo de verificar a especificidade e sensibilidade dos diversos parâmetros utilizados na caracterização da anemia por deficiência de ferro. A tabela 9 mostra os resultados encontrados pelos autores¹¹⁶.

TABELA 9 - Sensibilidade e especificidade dos parâmetros utilizados para diagnóstico de anemia por deficiência de ferro.

	SENSIBILIDADE %	ESPECIFICIDADE %
VCM	100	96,2
HCM	100	97,4
Fe sérico	73,9	83,1
Cap. Transporte	81,8	74,2
I.S.	90,9	60,6
Ferritina	82,6	66,7

Fonte: adaptado de Hershko et alii¹¹⁶.

Baseados, portanto, nesses dados de literatura e nos comentários anteriormente realizados, para os respectivos parâmetros, no presente estudo consideramos como anêmicas por deficiência de ferro, aquelas crianças que apresentaram nível de hemoglobina abaixo de 11 g/dl, VCM inferior a 73 fl e HCM inferior a 25 nng. A sensibilidade desses três parâmetros associados, em detectar a anemia por deficiência de ferro, foi de 100%, visto que todos os pacientes responderam à terapêutica com ferro.

Não utilizamos o critério ferritina abaixo de 12 ng/dl para seleção desse grupo porque, de acordo com dados encontrados na literatura, valores normais têm sido encontrados em

crianças comprovadas com deficiência de ferro. Os nossos dados concordam com os da literatura já que das 30 crianças que foram comprovadas deficientes em ferro, 6 apresentaram ferritina > 12 ng/dl, caracterizando um valor preditivo desse parâmetro em relação à amostra de 80%. Já o valor preditivo para o VCM e HCM foi de 100%, pois todos os pacientes com níveis inferiores ao normal para esses parâmetros responderam à terapêutica com ferro.

O grupo controle foi selecionado com base nos níveis de hemoglobina > 11 g/dl, VCM > 73 fl⁷⁵ e HCM > 25 nng²¹⁹. Entretanto, esses parâmetros podem não detectar estádios iniciais da deficiência de ferro e, portanto, decidimos avaliar os seus depósitos teciduais para melhor caracterização dos grupos, uma vez que a administração de ferro, como prova terapêutica, aos controles, não é eticamente indicada.

A avaliação dos depósitos teciduais de ferro pode ser feita diretamente pela visualização da presença desse metal em material obtido por punção de medula óssea ou biópsia hepática, ou indiretamente pela determinação da ferritina sérica. Optamos por este último, por não ser um método invasivo, característica dos dois primeiros, e por se correlacionar satisfatoriamente com a presença e quantidade de ferro dos depósitos teciduais^{44, 49, 63, 75, 148, 149, 161, 170, 173, 287}.

A determinação da ferritina, por radio-imuno-ensaio em nível inferior a 12 ng/dl é um indicador específico da deficiência de ferro⁴⁹. Saliente-se, entretanto, que valores

normais não excluem essa possibilidade. Por exemplo, DALMANN estudando um grupo de 225 crianças, com determinações laboratoriais seriadas durante o primeiro ano de vida, verificou que seis delas apresentaram deficiência de ferro caracterizada por hemoglobina abaixo de 11 g/dl, VCM \leq 70 fl e índice de saturação da transferrina abaixo de 10%. Todas essas crianças apresentavam ferritina dentro dos limites da normalidade⁷⁵. A causa de níveis normais de ferritina, em presença de deficiência de ferro, no primeiro ano de vida, não está bem explicada. Em idades acima de um ano, esse fato pode ser explicado por infecções, anemias hemolíticas, febres, doenças inflamatórias, neoplasias e hepatopatias^{49, 70, 149}.

Observando os valores de ferritina sérica obtidos para os nossos grupos de estudo, encontramos que sete controles (números 21, 22, 29, 54, 61, 63 e 72), embora selecionados segundo os critérios hematológicos estabelecidos, apresentaram ferritina sérica inferior a 12 ng/dl, sendo, portanto, caracterizados como deficientes em ferro, sem anemia. Essas crianças estavam distribuídas entre os quatro grupos para determinação dos valores normais das técnicas utilizadas na avaliação da função dos PMN, de tal modo que representaram, no máximo, 10% do número de crianças, para cada técnica.

Por outro lado, seis pacientes (números 10, 13, 16, 17, 19 e 23) com anemia ferropriva, apresentaram níveis elevados de ferritina. Esses pacientes, quando reavaliados após a administração de ferro, demonstraram uma elevação do nível de hemoglobina, e con-

comitante aumento do número de reticulócitos, confirmando, pela prova terapêutica^{75, 208}, o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro. Com base nos elementos clínicos e de hemograma, não conseguimos detectar a causa (entre as mais frequentes: infecção, febre, doença crônica) da elevação da ferritina. Esses dados estão de acordo com aqueles referidos por DALLMAN.

5.1.3. Estado Nutricional

Existem evidências que a desnutrição afeta a função dos PMN^{53, 54, 248}. CHANDRA & SARAYA⁵⁴ encontraram diminuição da migração ao acaso em crianças desnutridas e, quando na presença de infecção, observaram também diminuição da quimiotaxia nesses pacientes. Acreditam que esses defeitos funcionais possam ser decorrentes de alterações na membrana celular, causadas por privação calórico-protéica, além da diminuição da actina contrátil ou da sua capacidade de polimerização.

SELVARAJ & BHAT²⁴⁸ encontraram redução da atividade glicolítica durante a fagocitose pelos PMN de crianças desnutridas; os resultados, obtidos pelos mesmos autores, para avaliação do poder bactericida foram significativamente mais baixos para os PMN dos desnutridos que para aqueles dos controles.

Para evitar que o possível comprometimento da função dos PMN pudesse ser atribuído à desnutrição, procuramos excluí-la, baseados nos critérios de peso e estatura, utilizando como referência aqueles valores encontrados por Marcondes, classe IV de Santo André²⁹².

Observamos que houve predomínio dos pesos inferiores à média, nos pacientes com anemia, quando comparados com os pesos dos controles (tabela 2). Esta observação está de acordo com o trabalho de JUDISCH et alii¹³² que demonstrou que a deficiência de ferro leva a um retardo no ganho ponderal.

5.1.4. Outras variáveis

Outras situações clínicas que pudessem estar associadas às alterações dos PMN foram excluídas com base em parâmetros laboratoriais. Entre esses, estipulamos que o número de leucócitos não fosse superior a $15,000/\text{mm}^3$, baseados na citação de BUCKLEY⁴² de que leucocitose acima desse nível foi encontrada associada com significativo grau de anergia.

Outro critério de exclusão foi a presença de eosinofilia acima de 10%, pois além da possível associação com manifestações de atopia, essas células podem apresentar maior velocidade no desencadeamento do metabolismo oxidativo, quando comparadas com os PMN²¹, fato esse que poderia influenciar os resultados da avaliação funcional desses últimos.

Como existem evidências que em algumas situações clínicas os PMN podem ser ativados e com isso perder parte de seu material intra-celular, no processo de degranulação, diminuindo a sua densidade, procuramos verificar se a falta de ferro poderia influenciar a densidade dos neutrófilos estudados. Na nossa casuística nenhum paciente e nenhum controle apresentou essa alteração quando estudados mediante a utilização de ficoll-hypaque $d = 1077$.

5.2. AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS FUNCIONAIS DOS PMN

5.2.1. Quimiotaxia

Os PMN são dotados de mobilidade ativa, característica que assume importância nas respostas do organismo a infecções⁴⁸. Essa mobilidade ativa quando dirigida ou orientada, induzida por um gradiente de substância química, é chamada de quimiotaxia; quando o movimento se faz na ausência de qualquer estímulo químico é chamado de migração ao acaso; a mobilidade celular pode também ser estimulada de maneira não orientada, sendo então conhecida por quimiocinese²⁵⁴.

A avaliação da resposta quimiotática dos leucócitos "in vitro" pode ser feita basicamente por dois métodos:³⁰ O primeiro envolve a observação microscópica do comportamento individual das populações de células, diretamente ou por intervalos de tempo, mediante cinematografia⁵⁶; o segundo mede as alterações na distribuição de uma população de células, na presença ou ausência de agente quimiotático e compreende duas técnicas básicas, com algumas variações^{2, 26, 77, 94, 101, 130, 162, 185, 195, 205, 228}. Essas técnicas são: a da câmara de Boyden e a da migração sob agarose.

A técnica da câmara de Boyden utiliza uma câmara dividida em dois compartimentos por um filtro de microporos³⁰. Os leucócitos são colocados no compartimento superior e o agente quimiotático no compartimento inferior. Após um tempo de incubação, a resposta é avaliada por coloração das células que migram através do filtro ou por medir a radioatividade das células previamente marcadas, na parte inferior e superior do filtro. Esse método apresenta algumas objeções de ordem téc-

nica, conforme a variação instituída: necessidade de contar um grande número de células, ação da gravidade facilitando o deslocamento dos PMN através do filtro, alto custo inicial das câmaras utilizadas, tortuosidade e tamanho dos poros e adesividade das células ao filtro ^{30,294}.

Na técnica de migração sob agarose, o agente quimiotático e o meio controle são colocados em orifícios diametralmente opostos, equidistantes de um reservatório central, onde são colocadas as células. As distâncias percorridas pelos PMN são medidas após fixação. Essa técnica não apresenta os inconvenientes da ação da gravidade; permite avaliar, após fixação, as alterações morfológicas dos PMN, e é de menor custo ¹⁹³. Por esses motivos, optamos em nosso trabalho, pela técnica de migração sob agarose.

Os mecanismos celulares e moleculares de quimiotaxia dos leucócitos também têm sido estudados por vários autores ^{12,236,244}. Sucintamente, o reconhecimento de um estímulo quimiotático se faz mediante receptores de superfície de membrana; a ele se seguem alterações morfológicas características, na dependência da disposição dos microfilamentos de actina, centríolos e microtúbulos, que constituem a maquinaria de locomoção celular ^{171,201}.

Os fatores quimiotáticos desencadeiam também uma série de eventos bioquímicos intracelulares e associados à membrana. Tais eventos compreendem: alterações do potencial da membrana que atinge uma hiperpolarização, relacionada com o influxo aumentado de cálcio e sódio e saída de potássio da célula; ativação de processos metabólicos, com aumento do AMP cíclico, ati-

vação de fosfolipases, aumento do metabolismo do ácido araquidônico^{30,254}. Não há evidências da participação ativa de compostos dependentes de ferro.

MACDOUGALL et alii, VAN HEERDEN et alii, avaliando a quimiotaxia dos PMN de crianças com anemia férropriva, não demonstram alterações em relação às respostas dos PMN dos controles^{167,275}.

Nossos resultados são concordantes com os dos autores citados, não havendo sido encontrada diferença entre os valores de migração dos PMN dos pacientes pré e pós tratamento, em relação aos controles.

A tabela 5 apresenta os resultados de migração ao acaso, estimulada, o diferencial quimiotático e o índice quimiotático. As diferenças entre os valores do grupo controle e os do grupo com anemia por deficiência de ferro não variaram significativamente. Esses resultados concordam com aqueles descritos na literatura e corroboram os achados experimentais que levam à suposição de que a quimiotaxia não depende do ferro.

5.2.2. Redução do NBT

O NBT, na sua forma cristalina, é um sal oxidado, de cor amarela, solúvel em água, de baixo potencial de óxido-redução e com a capacidade de competir com o oxigênio molecular, como receptor de elétrons. Quando reduzido, forma composto de cor azul escura, insolúvel em água, um formazan^{160,212,213,245}.

Quando o metabolismo oxidativo dos PMN é estimulado, os radicais livres resultantes da redução do oxigênio molecular podem ceder elétrons que vão entrar em contacto com o NBT e reduzi-lo a formazan, constituindo um indicativo, "in vitro", das capacidades de ingestão e microbicida da célula, sendo utilizado na caracterização das alterações do metabolismo oxidativo celular^{188, 189}.

Um exemplo dessas alterações é encontrado na doença granulomatosa crônica (DGC), na qual se verifica um defeito ao nível da enzima NADPH oxidase; os PMN dos pacientes ingerem, porém não conseguem destruir bactérias, devido ao déficit na produção de radicais tóxicos derivados do oxigênio²³. Consequentemente, também não reduzem o NBT ou o fazem muito lentamente²¹². Além da NADPH oxidase, outras enzimas, algumas ainda não identificadas, participam dos processos que levam à redução do NBT²¹⁸.

Dois procedimentos técnicos podem ser utilizados para avaliar a redução do NBT pelos PMN: o histoquímico, qualitativo, introduzido por PARK et alii²¹², no qual se observa a presença de depósitos de formazan nos PMN; o espectrofotométrico, quantitativo, introduzido por BAEHNER & NATHAN²³, que avalia a intensidade de coloração violácea do NBT reduzido, em solução.

Tanto um quanto outro podem ser utilizados em repouso ou com estímulo para fagocitose. Quando em repouso, pode ser utilizado para diagnóstico de infecção em atividade; quando sob estímulo, nos dá informação do estado funcional da célula^{105, 147, 188, 211, 250, 258}.

MACDOUGALL et alii, VAN HEERDEN et alii estudaram a redução do NBT pelos PMN de crianças com anemia ferropriva e não encontraram diferenças em relação aos controles ^{167,275}.

CHANDRA ⁵², ao contrário, encontrou valores significativamente menores na redução do NBT pelos PMN de 12 crianças com anemia ferropriva, em relação à redução pelos PMN dos controles, sem deficiência de ferro. O autor expressou os resultados em diferença de densidade óptica, e observou correção dos mesmos após 04 a 07 dias da administração de ferro parenteral.

Os resultados aparentemente conflitantes podem ser explicados devido à técnica empregada para a realização do teste de redução do NBT. Os primeiros autores utilizaram a técnica qualitativa de PARK et alii ²¹², modificada por SHER et alii ²⁵⁰; essa apresenta menor sensibilidade quando comparada com o método utilizado por CHANDRA, que é o quantitativo de BAEHNER & NATHAN ²³. Esse último não depende da subjetividade do observador e permite detectar, inclusive, portadores de DGC, o que não é evidenciado com o método qualitativo.

Nossos resultados são parcialmente concordantes com os de CHANDRA, no sentido da diminuição da redução do NBT. Embora tenhamos encontrado valores mais baixos para os PMN das crianças com anemia por deficiência de ferro, tanto em repouso como ativado, não verificamos diferença estatisticamente significativa entre os resultados do grupo de pacientes pré-tratamento e os dos controles, no que se refere às diferenças dos valores ativado e repouso (tabela 6). Os resultados persistiram semelhantes para o grupo de pacientes pós-tratamento.

Esse fato significa que os pacientes com anemia ferro-priva não perderam a capacidade de responder a um estímulo, embora o façam a partir de um valor em repouso mais baixo que o normal.

Por não dispormos dos dados obtidos por CHANDRA, em relação aos níveis de hemoglobina e aos valores de redução do NBT de forma ativada e em repouso, não podemos avaliar as causas da diferença entre a suposta inexistência de resposta à ativação para os pacientes do autor e a presença da mesma para os nossos pacientes.

A diferença entre ativado e repouso, entre os pacientes pré-tratamento e os controles, mostrou valores menores para os primeiros. Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa; esse dado pode ser explicado por não termos separado nossos pacientes de acordo com a intensidade da deficiência, já que, conforme CHANDRA, quanto maior for a deficiência, maior será o comprometimento da redução do NBT pelos PMN.

Em relação à falta de diferença entre os resultados obtidos para os pacientes pré e pós tratamento, acreditamos que seja devido ao tipo de terapêutica utilizada, uma vez que CHANDRA utilizou a dose total por via parenteral, enquanto o tratamento por nós instituído foi ferro via oral, com reavaliação em 03 a 07 dias, de onde podemos inferir que a dose por nós instituída foi insuficiente para repor, nesse período, os sistemas enzimáticos alterados.

5.2.3. Poder bactericida

A avaliação do poder bactericida dos PMN pode ser feita "in vitro", pela incubação dessas células com bactérias e opsoninas, cultivando-se então as bactérias viáveis em intervalos variados de tempo, estabelecendo-se a proporção de bactérias destruídas pelos PMN, em função desse tempo⁶¹.

Várias modificações técnicas têm sido propostas em adição à idéia básica da avaliação do poder bactericida^{4, 167, 270}. Em nosso trabalho, utilizamos o método de KAPLAN et alii¹³⁴ modificado, pela eficácia e simplicidade que o caracterizam.

O poder bactericida tem sido estudado por vários autores, em crianças com anemia por deficiência de ferro (tabela 10).

CHANDRA⁵² e CHANDRA & SARAYA⁵⁴ encontraram diminuição do poder bactericida dos PMN de crianças com anemia quando comparadas aos controles, sem deficiência de ferro. Após tratamento, com ferro parenteral ou oral, houve normalização dessa função dos PMN.

MACDOUGALL et alii também verificaram diminuição do poder bactericida nos 16 pacientes anêmicos estudados¹⁶⁷.

YETGIN et alii, da mesma forma constatarem alteração dessa função nas crianças com anemia ferropriva. Esses autores verificaram ainda que o poder bactericida dos PMN normalizou após 03 meses de terapêutica com o ferro por via oral²⁹⁰.

TABELA 10 - Avaliação do poder bactericida dos PMN de crianças com anemia por deficiência de ferro.

	Nº de Pacientes	Poder Bactericida	Tipo de tratamento tempo para normalização do P.B.
CHANDRA, R.K., 1973	12	Diminuído	Ferro parenteral 04 a 07 dias
CHANDRA, R.K. e SARAYA, A.K., 1975	20	Diminuído	Ferro parenteral ou oral 04 dias a 06 semanas
MACDOUGALL et alii 1975	20	Diminuído	Não testado
YETGIN. et alii, 1981	50	Diminuído	Ferro oral 03 meses
ARBETER et alii, 1971	9	Diminuído	Ferro oral ou paren- teral ± 40 dias

Nossos resultados são concordantes com a literatura; encontramos um reduzido poder bactericida dos PMN dos pacientes em relação aos controles; essa alteração não retornou ao normal, com a administração de ferro por via oral durante 03 a 07 dias.

Esse fato demonstra que o poder bactericida dos PMN é influenciado pela quantidade de ferro do organismo. Esse ferro poderia estar relacionado diretamente com os processos metabólicos intracelulares, servindo como cofator, ou então, sendo importante para a produção de proteínas ou enzimas relacionadas com os processos de destruição celular. Fato semelhante a esse ocorre em relação à síntese das cadeias de globina, na deficiência de ferro, as quais são produzidas na dependência da presença do ferro intracelular ¹²⁵.

Visto que a administração de ferro por via parenteral, durante quatro a sete dias, foi suficiente para corrigir o poder bactericida dos PMN dos pacientes estudados por CHANDRA e outros, e a não correção desse mesmo defeito quando a medicação foi utilizada via oral, supomos que o ferro ingerido em pequena quantidade poderia ser dirigido para sistemas preferenciais dentro do próprio compartimento dos neutrófilos, como também para outros sistemas de alta capacidade proliferativa, tais como o dos eritrócitos e o das células epiteliais do trato gastro-intestinal.

5.2.4. Iodinização

Entre os processos microbicidas dos PMN, salienta-se aquele que se relaciona com a incorporação de um halogênio na bactéria ou partícula fagocitada - o sistema MPO - H_2O_2 - halogênio ^{140, 141, 220}.

Para a ocorrência desse fenômeno, é necessária a integridade dos vários processos que levam à produção de H_2O_2 e da MPO.

"In vitro", esse sistema pode ser avaliado pela técnica de iodinação, descrita em 1971, por PINCUS. & KLEBANOFF²²⁰, na qual a uma suspensão de células estimuladas para fagocitose, se associa iodo radioativo; com a produção de H_2O_2 , pelos PMN, resultante da ativação do metabolismo oxidativo, o halogênio é incorporado à partícula fagocitada e às porções protéicas adjacentes. Tecnicamente, esse halogênio, no caso o iodo, é coletado após precipitação com ácido tricloroacético e a radioatividade verificada em contador de radiações gama.

Embora um déficit de atividade da MPO implique redução da iodinação, a ocorrência de uma iodinação diminuída não está obrigatoriamente ligada a uma alteração desse sistema, mas pode estar associada a alguns dos estádios precedentes, que levam à produção de H_2O_2 . Assim, esse teste tem sido indicado como uma avaliação de triagem de função dos PMN. Nas situações nas quais está comprovada a integridade dos sistemas que fornecem radicais do oxigênio, a iodinação é uma avaliação indireta da atividade da mieloperoxidase.

PRASAD²²¹ estudou a iodinação pelos PMN de sete crianças com anemia por deficiência de ferro e a encontrou reduzida quando comparada com aquela de seis controles sem anemia.

Entretanto, outros autores não puderam demonstrar uma diminuição desse sistema: SAGONE & BALCERZAK não encontraram diferença dos valores de MPO nos pacientes com anemia por deficiência de ferro²⁴⁰.

A avaliação direta da MPO, feita por YETGIN et alii²⁹⁰, em 50 crianças de 06 meses a 16 anos de idade, não apresentou diferença entre a atividade da MPO de crianças com anemia ferropriva e a dos controles.

Os nossos resultados são concordantes com os de PRASAD, demonstrando valores de iodinização inferiores para os pacientes em relação aos controles (tabela 7).

Esse autor sugeriu que a diminuição da iodinização pelos PMN se devia à diminuição da atividade da MPO, uma vez que a produção de radicais derivados da redução do oxigênio pelos PMN dos pacientes com deficiência de ferro foi igual à dos controles, indicando que a produção do substrato estava conservada, como pode ser verificado na tabela 11.

TABELA 11 - Resultados de iodinização e oxidação do ¹⁴C-Formato.

	Hb g/dl	Iodinização nmoles/10 ⁶ /30min cels.	Oxidação do ¹⁴ C-Formato cpm/10 ⁶ céls/30 min	
			Repouso	Ativado
Deficientes em ferro N = 6	4,7 ± 0,96	0,49 ± 0,099*	346,3 ± 33,36	792,0 ± 34,65**
Controles N = 5	16,0 ± 0,51	1,22 ± 0,22*	317,2 ± 35,32	637,0 ± 63,89**

* = Significativo p < 0,01

** = não significativo

Fonte: PRASAD, J.S. 1979.

No que se refere à produção de H_2O_2 e outros radicais derivados do oxigênio, os nossos resultados também são concordes com os do autor, como se verifica para redução do NBT, que apresentou resposta à ativação para fagocitose igual à dos controles, sugerindo também que o defeito na iodinação está relacionado com a diminuição da atividade da MPO. Além disso, os nossos pacientes apresentaram correção desse defeito após a administração de ferro, por um período de três a sete dias, descrito como sendo suficiente para a reposição enzimática.

A correção parcial do poder bactericida e total da iodinação sugere que pelo menos mais que um mecanismo¹⁴³ dependente do ferro está envolvido nas funções de defesa dos PMN. A diferença no tempo para correção dessas duas funções pode residir no fato de que no sistema mieloperoxidase, é suficiente apenas a reposição dessa enzima, o que ocorre rapidamente, enquanto nos demais sistemas bactericidas, talvez haja necessidade, além da reposição enzimática, da síntese de outras proteínas que dependem de um nível de depósito de ferro mais elevado.

Alguns trabalhos experimentais e clínicos demonstram que o ferro livre circulante - seja pela administração excessiva ou pela inexistência relativa no organismo de substâncias capazes de impedir a sua liberação - pode ser utilizado pelas bactérias, levando a um aumento da incidência de infecções. Esses trabalhos têm sugerido que não se faça suplementação férrea para populações com risco de infecções entéricas, tais como aquelas que concomitantemente apresentam deficiência calórico-protéica.

Entretanto, os resultados com grupos populacionais carentes têm demonstrado a correção da anemia sem aumento secundário de infecções, quando o ferro é administrado em doses relativamente baixas⁷⁵. O nosso trabalho também evidencia que baixas doses são suficientes para corrigir algumas das funções dos PMN, sugerindo, portanto, melhora nas defesas desses pacientes contra infecções.

Dessa forma, parece-nos que os benefícios advindos da administração de ferro em baixas doses devem ser considerados em grupos populacionais como o nosso, nos quais a prevalência da deficiência de ferro é alta.

6 . CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

1. Os PMN de crianças com anemia por deficiência de ferro apresentam quimiotaxia e migração ao acaso semelhantes àsquelas dos PMN dos controles.
2. A redução do NBT pelos PMN de crianças com anemia por deficiência de ferro, em repouso e ativados, é inferior àquela apresentada pelos PMN dos controles sem anemia, não normalizando após um período de administração de ferro de três a sete dias.
3. A diferença entre os valores de redução do NBT pelos PMN ativados e em repouso (A-R) foi semelhante para os dois grupos.
4. Os resultados da avaliação do poder bactericida apresentados pelos PMN dos pacientes com anemia por deficiência de ferro demonstram diminuição dessa função em relação aos PMN dos controles, não normalizando após tratamento com ferro por três a sete dias.

5. A iodinação pelos PMN dos pacientes com anemia por deficiência de ferro é inferior à dos controles, normalizando após curto período de tratamento oral.
6. A correção total da iodinação e parcial da redução do NBT e do poder bactericida nos permitem supor que, além do sistema MPO-H₂O₂-halogênio, outros mecanismos dependentes do ferro participam das defesas dos PMN.

ANEXO J

IDENTIFICAÇÃO

Nome:
 Sexo:
 Idade:
 Data de nascimento:
 Procedência:

ANAMNESE

Queixa principal: palidez -
 irritabilidade -
 astenia -
 anorexia -
 retardo de crescimento -
 outra -

História Mórbida Pregressa:

 infecções de repetição -
 tipo I.V.A.S. -
 gastroenterite -
 piodermite -
 outras -

Medicações utilizadas:

EXAME FÍSICO:

Peso: (%)

Estatura: (%)

Alterações tróficas: pele
 língua
 unhas

Esplenomegalia:

Outras alterações:

ANEXO II - Identificação, procedência, idade, sexo
e cor dos controles.

nº	Identificação	Procedência*	Idade (anos)	Sexo	Cor
1	P.V.S.	LELJC	5 7/12	F	B
2	C.V.S.	LELJC	4 7/12	M	B
3	A.O.	LELJC	5 1/12	F	B
4	A.O.	LELJC	2 10/12	M	B
5	C.V.S.	LELJC	5 2/12	F	B
6	A.A.S.	LELJC	3 8/12	M	B
7	L.G.	LELJC	2 2/12	M	B
8	L.M.W.	LELJC	2 3/12	M	B
9	M.A.	LELJC	2 3/12	M	B
10	M.A.	LELJC	4 8/12	F	B
11	R.K.L.	LELJC	2 11/12	F	P
12	A.L.	LELJC	2 1/12	M	B
13	M.P.	LELJC	5 9/12	M	B
14	M.H.C.	LELJC	4 10/12	M	B
15	J.D.	H.C.	5	F	B
16	M.R.	LELJC	4 2/12	F	B
17	E.P.S.	LELJC	2 2/12	M	B
18	J.G.	LELJC	3 3/12	F	B
19	L.L.S.	LELJC	4 6/12	F	P
20	E.D.	LELJC	2 4/12	F	B
21	J.M.N.	LELJC	2 8/12	F	B
22	F.S.N.	LELJC	5 8/12	M	B
23	F.F.S.	LELJC	5	F	B
24	N.A.O.	LELJC	4 9/12	F	B
25	A.A.C.	LELJC	5	F	B
26	A.M.	LELJC	5 5/12	M	B
27	L.A.S.	LELJC	5 11/12	F	B
28	A.R.R.	LELJC	4 8/12	F	B
29	I.S.J.	LELJC	2 4/12	M	B
30	F.Z.	LELJC	3 1/12	M	B
31	A.L.C.	LELJC	5 7/12	M	B
32	N.M.	LELJC	3 4/12	M	B
33	C.X.C.	LELJC	5 2/12	F	B

Cont.

ANEXO II (CONT.) - Identificação, procedência, idade, sexo e cor dos controles.

nº	Identificação	Procedência *	Idade (anos)	Sexo	Cor
34	W.S.L.	LELJC	4 6/12	M	B
35	L.C.L.	LELJC	5 7/12	M	B
36	A.M.M.	LELJC	5 2/12	F	B
37	C.V.S.	LELJC	4 8/12	M	B
38	E.A.A.	LELJC	5 1/12	F	B
39	A.L.C.	LELJC	3 2/12	F	B
40	R.C.S.	LELJC	2 9/12	F	B
41	J.T.S.	LELJC	5	M	B
42	N.C.L.	LELJC	5 7/12	F	B
43	E.O.L.	LELJC	5 1/12	M	B
44	S.N.C.	LELJC	4 3/12	M	B
45	G.V.S.	LELJC	4 2/12	M	B
46	E.M.P.	LELJC	3 10/12	F	B
47	M.R.	LELJC	5 3/12	F	B
48	J.O.	LELJC	4 6/12	M	B
49	M.S.	LELJC	5	M	B
50	A.M.B.	LELJC	5 8/12	F	B
51	J.A.A.	LELJC	3 11/12	F	B
52	A.S.	LELJC	5 10/12	F	B
53	S.P.S.	CEDIT	5 9/12	M	P
54	M.T.	CEDIT	5 4/12	M	B
55	I.S.	CEDIT	5	M	P
56	L.C.R.	CEDIT	5 1/12	M	B
57	O.S.	CEDIT	4 2/12	M	B
58	J.G.S.	CEDIT	3 1/12	F	B
59	A.A.S.	LELJC	4 7/12	F	B
60	V.C.A.	LELJC	5 3/12	F	B
61	P.C.V.	LELJC	3 3/12	M	B
62	A.S.B.	LELJC	3 3/12	F	B
63	A.R.	LELJC	3 4/12	M	B
64	A.P.	H.C.	5 10/12	M	B
65	A.M.M.	H.C.	5 1/12	F	B
66	A.N.	H.C.	3 5/12	M	B

Cont.

ANEXO II (CONT.) - Identificação, procedência, idade, sexo e cor dos controles.

nº	Identificação	Procedência *	Idade (anos)	Sexo	Cor
67	A.A.	H.C.	5 8/12	M	B
68	D.A.O.	H.C.	4 3/12	F	B
69	F.A.S.	CEDIT	4	M	B
70	F.L.	CEDIT	2 6/12	M	B
71	J.S.	H.C.	5 2/12	F	B
72	K.C.J.	LELJC	3 10/12	F	B
73	N.M.	LELJC	5 7/12	M	B
74	P.G.	LELJC	4 9/12	M	B
75	P.C.M.	LELJC	2 11/12	F	B
76	W.D.S.	LELJC	4 8/12	M	B
77	T.A.	H.C.	5 8/12	F	B
78	L.A.Z.	CEDIT	4 2/12	F	B
79	R.C.S.	CEDIT	3 1/12	F	B
80	M.R.C.	LELJC	2 8/12	M	B

* H.C. = Hospital de Clínicas

LELJC = Lar Escola Dr. Leocádio José Correia

HCCP = Hospital de Crianças César Pernet

HIPP = Hospital Infantil Pequeno Príncipe

CEDIT = Centro de Estudo, Diagnóstico e Indicação de Tratamento.

ANEXO III - Identificação, procedência, idade, sexo
e cor dos pacientes.

nº	Identificação	Procedência*	Idade (anos)	Sexo	Cor
1	A.C.S.	H.C.	2	M	B
2	G.A.A.	H.C.	2	M	B
3	E.C.	H.C.	2 2/12	M	B
4	A.O.	H.C.	5 7/12	M	B
5	D.M.S.	H.C.	4 6/12	F	B
6	J.D.	H.C.	2 2/12	M	B
7	I.G.	H.C.C.P.	3 4/12	F	B
8	A.P.	H.C.	4 9/12	M	B
9	P.C.	H.C.C.P.	3 5/12	M	B
10	W.S.	H.C.	2 8/12	M	B
11	A.E.M.	H.C.	2 4/12	M	B
12	A.C.L.	H.C.	3 2/12	F	B
13	S.M.R.	H.C.	3 2/12	F	B
14	L.R.	H.C.C.P.	4 6/12	F	B
15	A.F.	H.C.	2	M	B
16	J.C.	CEDIT	2	M	B
17	M.G.	CEDIT	2 4/12	M	B
18	J.F.	H.C.	2 4/12	M	B
19	E.M.S.	H.I.P.P.	2 6/12	F	B
20	J.R.C.	H.C.	5 2/12	M	B
21	J.S.	H.C.	2 7/12	F	B
22	J.B.S.	H.I.P.P.	4 4/12	M	B
23	M.P.V.	H.C.C.P.	3 2/12	F	B
24	L.F.L.	I.P.M.C.	2	M	B
25	W.R.	H.C.	5 2/12	M	B
26	C.R.B.	H.I.P.P.	2 4/12	M	B
27	A.D.	H.C.	5 10/12	M	B
28	D.D.	H.C.	4 2/12	M	B
29	E.L.S.	LELJC	2 1/12	M	B
30	M.L.C.	H.C.C.P.	2 1/12	M	B

* H.C. = Hospital de Clínicas
 LELJC = Lar Escola Dr. Leocádio José Correia
 HCCP = Hospital de Crianças César Pernet
 HIPP = Hospital Infantil Pequeno Príncipe
 CEDIT = Centro de Estudo, Diagnóstico e Indicação de Tratamento.

ANEXO IV - Peso e estatura dos controles

nº	Peso kg	Intervalo em relação à média *	Estatura cm	Intervalo em relação à média*
1	18,8	(2-3)	113,3	(3-4)
2	16,1	(2-3)	106,0	(3-4)
3	17,2	(2-3)	106,0	(2-3)
4	13,4	(2-3)	92,5	(2-3)
5	18,0	(2-3)	108,0	(2-3)
6	15,0	(2-3)	95,7	(2-3)
7	14,0	(3-4)	89,0	(3-4)
8	12,8	(2-3)	86,5	(2-3)
9	12,9	(2-3)	86,0	(1-2)
10	19,1	(3-4)	109,0	(3-4)
11	15,9	(3-4)	94,5	(4-5)
12	13,5	(3-4)	88,5	(2-3)
13	18,0	(2-3)	109,8	(2-3)
14	18,5	(3-4)	109,0	(3-4)
15	19,0	(3-4)	107,5	(3-4)
16	15,0	(2-3)	97,5	(2-3)
17	13,0	(3)	86,0	(2-3)
18	14,8	(2-3)	96,5	(3)
19	17,8	(3-4)	104,0	(2-3)
20	12,9	(2-3)	84,5	(1-2)
21	11,7	(1-2)	86,0	(1-2)
22	22,7	(3-4)	121,5	(5)
23	20,2	(3-4)	113,3	(4-5)
24	19,7	(3-4)	105,5	(2-3)
25	18,0	(2-3)	110,0	(3-4)
26	20,1	(3-4)	112,5	(3-4)
27	17,5	(2-3)	106,5	(1-2)
28	19,1	(3-4)	106,8	(3-4)
29	12,5	(2-3)	88,5	(2-3)
30	13,6	(2-3)	98,0	(3-4)
31	19,0	(2-3)	120,5	(5)
32	15,8	(3-4)	93,5	(3)
33	21,7	(3-4)	112,5	(3-4)

cont.

ANEXO IV (CONT.) - Peso e estatura dos controles

nº	Peso kg	Intervalo em re- lação à média *	Estatura cm	Intervalo em re- lação à média *
34	15,0	(1-2)	101,0	(2-3)
35	18,0	(2-3)	107,8	(2-3)
36	21,7	(3-4)	114,0	(4-5)
37	16,6	(2-3)	105,0	(3)
38	17,0	(2-3)	103,5	(2)
39	13,0	(2)	89,5	(1-2)
40	13,3	(2-3)	97,0	(4)
41	16,0	(1-2)	107,7	(3-4)
42	17,5	(2-3)	106,1	(2-3)
43	19,0	(3-4)	109,5	(3-4)
44	15,9	(2-3)	101,0	(2-3)
45	17,0	(3)	104,5	(3-4)
46	14,9	(2-3)	95,5	(2-3)
47	18,0	(2-3)	107,5	(2-3)
48	19,7	(3-4)	107,5	(3-4)
49	20,0	(3-4)	107,8	(3-4)
50	19,6	(2-3)	116,0	(3-4)
51	14,5	(2-3)	97,8	(2-3)
52	19,3	(2-3)	112,0	(3-4)
53	18,0	(2-3)	108,0	(2-3)
54	22,0	(3-4)	118,0	(5)
55	19,0	(3-4)	108,0	(3-4)
56	18,9	(2-3)	103,0	(1-2)
57	17,0	(3)	106,0	(3-4)
58	14,2	(2-3)	95,0	(2-3)
59	15,0	(2)	99,0	(1-2)
60	19,8	(3-4)	111,5	(3-4)
61	14,8	(2-3)	93,0	(2)
62	15,3	(3-4)	93,0	(2)
63	12,8	(1-2)	92,5	(1-2)
64	17,9	(2)	109,5	(2-3)
65	18,6	(3)	111,0	(3-4)
66	13,1	(1-2)	93,5	(1-2)

cont.

ANEXO IV (CONT.) - Peso e estatura dos controles

nº	Peso kg	Intervalo em re- lação à média *	Estatura cm	Intervalo em re- lação à média *
67	20,8	(3-4)	111,5	(2-3)
68	15,4	(2-3)	100,0	(2-3)
69	16,2	(2-3)	99,0	(2-3)
70	12,9	(2-3)	89,0	(2-3)
71	20,4	(4-5)	110,0	(3-4)
72	15,6	(2-3)	99,0	(2-3)
73	19,0	(2-3)	106,5	(2)
74	18,8	(3-4)	108,0	(3-4)
75	12,8	(2-3)	90,5	(2-3)
76	15,5	(1-2)	101,0	(2)
77	22,0	(3-4)	117,0	(4)
78	15,0	(2-3)	98,5	(2-3)
79	12,7	(2)	91,5	(1-2)
80	12,5	(1-2)	89,5	(2-3)

* LEGENDA

1. - 1,96 DP
2. - 1,00 DP
3. Média
4. + 1,00 DP
5. + 1,96 DP

ANEXO V - Peso e estatura dos pacientes

nº	Peso kg	Intervalo em re- lação à média *	Estatura cm	Intervalo em re- lação à média *
1	12,4	(2-3)	86,0	(2-3)
2	14,3	(4-5)	90,0	(4-5)
3	11,8	(1-2)	85,0	(3-4)
4	18,8	(2-3)	106,0	(3)
5	17,0	(2-3)	101,0	(2-3)
6	13,0	(2-3)	86,0	(2-3)
7	13,2	(2)	91,0	(1-2)
8	20,1	(3-4)	107,0	(3-4)
9	14,7	(2-3)	98,0	(3)
10	14,0	(2-3)	90,0	(2)
11	14,5	(1-2)	97,0	(1-2)
12	12,8	(1-2)	93,5	(2-3)
13	13,0	(2)	90,0	(1-2)
14	16,0	(2-3)	102,0	(2-3)
15	12,1	(2-3)	86,0	(2-3)
16	11,5	(1-2)	84,0	(1-2)
17	11,8	(1-2)	86,0	(1-2)
18	13,8	(3)	89,0	(2-3)
19	12,2	(2-3)	94,0	(3-4)
20	23,0	(4-5)	109,0	(3-4)
21	12,0	(2)	87,0	(1-2)
22	14,5	(1-2)	101,5	(2-3)
23	14,5	(2-3)	95,0	(4)
24	12,0	(2-3)	84,0	(1-2)
25	22,0	(4)	113,0	(4-5)
26	13,5	(2-3)	90,0	(3)
27	23,8	(3-4)	118,0	(4)
28	17,5	(3-4)	103,0	(3-4)
29	12,6	(2-3)	85,0	(2)
30	11,0	(1-2)	83,0	(1-2)

* LEGENDA

1. - 1,96 DP
2. - 1,00 DP
3. Média
4. + 1,00 DP
5. + 1,96 DP

ANEXO VI - Valores hematemétricos dos controles

nº	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (nng)	CHCM (g/dl)
1	14,5	80	27,3	34,4
2	13,3	82	27,6	34,2
3	11,4	80	26,0	32,7
4	12,2	77	25,5	33,3
5	13,6	80	27,0	34,1
6	13,2	83	28,3	34,2
7	12,9	84	28,4	33,8
8	13,6	75	25,0	34,3
9	11,9	87	27,0	31,0
10	12,4	86	28,1	32,6
11	13,0	79	25,0	31,6
12	12,4	78	25,6	33,3
13	13,3	75	25,9	34,9
14	12,6	80	28,8	33,8
15	13,5	89	29,9	34,0
16	12,5	77	25,5	33,3
17	12,0	77	25,5	33,3
18	13,3	75	25,9	34,9
19	11,8	73	25,0	33,7
20	12,9	84	28,4	33,6
21	12,6	80	26,4	33,3
22	11,8	77	25,3	33,2
23	11,5	84	27,4	32,9
24	14,5	79	26,8	34,2
25	15,5	82	27,3	33,8
26	15,0	83	28,2	34,2
27	14,0	78	26,6	34,2
28	13,0	77	26,1	34,3
29	13,5	73	26,4	36,3
30	11,6	77	25,9	33,7
31	13,0	81	26,9	33,5
32	11,9	76	25,0	32,8
33	12,4	84	28,4	33,8

cont.

ANEXO VI (CONT.) - Valores hematimétricos dos controles

nº	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (nng)	CHCM (g/dl)
34	11,9	80	26,2	33,1
35	14,6	80	28,0	35,3
36	13,1	74	25,1	34,2
37	11,4	87	28,9	34,2
38	13,5	81	27,9	34,2
39	11,6	77	25,0	32,7
40	13,2	77	25,8	34,3
41	13,2	76	25,4	33,8
42	14,2	81	27,8	34,8
43	12,1	73	24,5	34,1
44	13,5	79	29,2	36,8
45	14,8	81	27,5	34,2
46	13,0	79	25,8	32,6
47	12,5	86	28,4	33,0
48	13,7	85	28,8	33,9
49	13,1	79	25,5	32,4
50	14,1	86	28,8	33,3
51	12,4	84	26,9	32,2
52	14,9	75	25,0	32,0
53	14,8	81	27,5	34,2
54	12,6	78	26,7	34,3
55	12,3	79	25,7	32,6
56	12,1	80	26,3	32,8
57	13,6	73	25,0	34,2
58	14,0	75	25,3	33,7
59	11,5	73	25,0	34,2
60	12,3	80	26,5	33,2
61	13,2	80	27,5	34,3
62	13,4	82	29,1	35,3
63	14,0	79	26,4	33,5
64	13,3	76	27,1	35,6
65	13,1	74	25,1	34,2
66	13,9	79	27,9	35,4

cont.

ANEXO VI (CONT.) - Valores hematimétricos dos controles

nº	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (nng)	CHCM (g/dl)
67	14,0	79	26,4	33,5
68	12,8	75	25,3	33,9
69	13,8	85	29,2	34,2
70	12,4	76	25,7	33,8
71	12,8	84	28,9	34,4
72	12,3	80	26,5	33,2
73	12,8	83	28,4	33,9
74	14,7	82	28,8	35,1
75	13,5	78	26,3	33,6
76	12,8	81	28,6	35,3
77	15,1	85	29,4	34,6
78	14,0	78	26,6	34,2
79	13,2	77	28,0	36,7
80	12,6	77	25,5	33,2

ANEXO VII - Valores hematimétricos dos pacientes pré-tratamento.

nº	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (nng)	CHCM (g/dl)	Ret. (%)
1	9,1	59	17,5	30,0	1,1
2	8,6	62	18,1	29,6	0,8
3	8,0	58	17,4	30,3	0,2
4	6,7	53	14,7	27,7	0,2
5	9,8	70	24,7	33,4	0,1
6	6,6	52	14,8	28,4	1,5
7	9,3	69	23,7	34,8	0,4
8	10,8	67	22,0	32,5	1,0
9	4,2	56	21,5	38,1	2,8
10	6,8	54	15,5	28,6	1,8
11	6,9	47	13,6	28,9	0,4
12	9,8	57	18,8	33,0	0,2
13	10,9	70	24,4	31,3	0,2
14	6,1	56	15,0	26,5	2,1
15	9,7	70	23,0	32,5	0,5
16	8,4	59	17,7	30,3	0,9
17	10,2	62	19,2	32,2	0,7
18	7,8	49	15,3	31,3	0,3
19	9,9	62	20,4	32,5	0,1
20	10,7	64	21,3	34,1	0,3
21	8,4	56	16,2	28,9	0,2
22	9,1	64	19,7	30,4	0,2
23	5,5	64	16,0	25,0	1,1
24	9,7	67	21,7	32,3	0,2
25	6,1	54	13,0	24,0	0,3
26	8,5	55	16,5	30,2	0,5
27	9,9	52	16,9	32,5	0,8
28	7,8	49	15,3	31,3	0,1
29	8,5	53	15,0	28,3	1,9
30	5,6	50	14,2	28,4	0,2

ANEXO VIII - Valores hematimétricos dos pacientes pós-tratamento.

nº	Hb (g/dl)	VCM (fl)	HCM (nng)	CHCM (g/dl)	Ret. (%)
1	9,5	59	18,1	31,0	1,2
2	10,0	65	20,3	31,0	1,5
3	8,7	61	18,1	29,9	2,2
4	6,8	53	15,0	28,3	0,9
5	10,5	70	25,3	36,4	1,2
6	7,4	56	16,4	29,5	2,0
7	11,0	68	23,3	35,0	2,1
8	11,0	72	22,6	31,3	1,7
9	4,9	58	20,3	35,1	2,9
10	6,9	56	15,8	28,1	7,0
11	8,5	53	15,0	28,3	2,0
12	9,7	62	19,6	31,8	0,9
13	12,0	70	23,9	32,0	2,8
14	6,8	64	18,2	28,4	5,5
15	10,6	72	23,6	32,7	2,5
16	8,6	60	18,2	32,2	1,5
17	10,7	65	22,0	29,5	1,5
18	9,2	53	16,5	31,0	2,1
19	10,5	64	20,4	31,8	0,5
20	10,5	67	19,4	28,6	0,9
21	9,5	59	18,1	31,0	2,1
22	10,1	63	21,2	33,2	1,8
23	6,5	66	21,9	33,2	3,5
24	9,8	69	22,3	32,7	0,9
25	7,2	57	14,2	24,8	1,8
26	8,1	58	17,4	30,1	4,2
27	9,9	55	18,3	33,0	1,8
28	9,2	53	16,5	31,0	2,3
29	10,3	54	17,3	32,4	3,5
30	4,9	54	13,0	24,2	3,7

ANEXO IX - LEUCOMETRIA E DIFERENCIAL LEUCOCITÁRIA DOS CONTROLES

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
1	11000	5170	1	6	4	43	40	6
2	11300	6667	1	7	5	54	29	4
3	9200	2116	-	5	1	22	72	-
4	14000	6160	-	8	5	39	47	1
5	7200	3312	2	6	4	42	38	8
6	7900	2923	1	7	5	32	45	10
7	10100	4444	1	2	4	40	51	2
8	10900	4469	-	2	3	37	48	11
9	14800	5180	2	8	5	30	52	3
10	10700	3210	-	9	1	29	56	5
11	9900	4356	1	2	3	41	45	8
12	14900	9238	-	6	5	57	29	3
13	9400	4512	-	6	5	43	40	6
14	7100	3266	-	2	3	43	46	6
15	8000	3280	-	2	1	40	54	3
16	7900	3397	-	10	7	36	41	5
17	9900	5247	1	10	3	50	20	8
18	6400	2240	2	10	4	31	51	2
19	9700	5723	-	3	5	54	36	2
20	9700	4753	-	6	1	48	40	5

ANEXO IX (CONT.) - LEUCOMETRIA E DIFERENCIAL LEUCOCITÁRIA DOS CONTROLES

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
21	10200	4896	-	10	4	44	33	9
22	10200	6120	-	3	-	60	34	3
23	6800	2312	-	1	2	32	61	4
24	11300	6667	-	4	4	55	33	4
25	12500	6625	1	5	4	49	40	2
26	10700	6206	1	1	7	51	34	6
27	5500	2970	1	5	-	54	36	4
28	13100	7467	-	1	1	56	41	1
29	10400	5096	-	8	4	45	39	4
30	5300	2544	-	10	4	44	42	-
31	6300	2268	-	2	3	33	61	1
32	14300	8723	-	10	6	56	24	4
33	9600	5280	-	6	3	52	34	5
34	9000	4680	-	3	7	45	40	5
35	7800	3900	1	2	-	50	40	7
36	8400	3360	-	2	-	40	58	-
37	11000	4400	1	8	6	34	50	1
38	11800	8732	-	2	1	73	20	5
39	13500	4590	-	4	4	30	60	3
40	9900	3861	-	10	5	34	51	-

cont.

ANEXO IX (CONT.) - LEUCOMETRIA E DIFERENCIAL LEUCOCITÁRIA DOS CONTROLES

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
41	8800	5456	1	4	1	61	23	10
42	9700	4268	3	10	3	41	36	7
43	8600	4902	-	5	6	51	36	2
44	5500	3960	-	4	12	59	21	4
45	7900	4029	-	10	6	45	38	1
46	11100	6660	-	7	8	52	29	4
47	7900	3555	-	9	7	38	41	5
48	9400	6298	-	-	3	64	23	10
49	12700	6985	-	5	5	50	38	2
50	10600	5830	-	3	4	51	37	-
51	8900	4450	-	6	6	44	42	2
52	14000	8400	-	2	4	56	35	3
53	6500	3250	1	8	5	45	40	1
54	10200	5304	-	4	8	44	30	6
55	11200	7616	-	6	5	63	25	1
56	12500	7125	-	10	3	54	30	3
57	12100	7139	-	1	6	53	32	8
58	9800	6174	-	-	5	58	35	2
59	7800	4056	-	2	5	47	44	2
60	14300	5434	-	8	2	36	48	6

cont.

ANEXO IX (CONT.) - LEUCOMETRIA E DIFERENCIAL LEUCOCITÁRIA DOS CONTROLES

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
61	7500	4800	-	6	4	60	27	3
62	8500	5610	2	2	4	62	20	10
63	9200	2484	1	6	-	27	62	4
64	8700	5220	-	2	4	56	36	2
65	8200	4674	1	8	3	54	31	3
66	12100	7865	-	2	1	64	26	7
67	9200	4508	1	4	-	49	42	4
68	7600	3648	-	4	3	45	48	-
69	10600	5936	-	6	-	56	14	4
70	10800	3240	-	-	4	26	67	3
71	9500	5795	-	6	4	57	33	-
72	14300	5434	-	8	2	36	48	6
73	13900	6394	1	7	1	45	40	6
74	12600	7812	-	3	8	54	27	8
75	11100	7104	-	1	5	59	28	6
76	10500	4200	-	6	4	36	54	-
77	11100	5217	-	4	3	44	43	6
78	5500	2970	1	5	-	54	36	4
79	7200	4464	-	6	5	57	38	4
80	8800	2376	-	10	-	27	60	3

ANEXO X - Leucometria e diferencial leucocitária dos pacientes com Anemia Ferropriva pré (a) e pós (b) tratamento.

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
1 a)	12600	6678	-	3	5	48	40	4
b)	12800	6400	-	9	1	49	36	5
2 a)	15000	7200	-	3	7	41	39	10
b)	14200	6816	-	3	5	43	41	8
3 a)	11000	4180	-	7	1	37	49	6
b)	13800	7590	-	3	1	54	37	5
4 a)	6100	2623	-	8	1	42	34	14
b)	6400	2752	-	5	3	40	42	10
5 a)	6600	2772	-	8	-	42	46	4
b)	6800	3128	-	6	2	44	44	4
6 a)	3700	1443	-	4	1	38	50	7
b)	4800	1920	-	5	6	40	44	5
7 a)	4200	1260	-	6	2	28	57	7
b)	9700	2522	-	5	1	25	60	9
8 a)	13000	7800	1	3	6	54	35	13
b)	11000	5280	1	4	7	41	37	10
9 a)	5050	1565	-	3	1	30	56	10
b)	6200	2356	-	4	3	35	50	8
10 a)	8500	2550	-	6	8	22	58	6
b)	11700	4914	-	4	1	41	36	7

ANEXO X (CONT.) - Leucometria e diferencial leucocitária dos pacientes com Anemia Ferropriva pré (a) e pós (b) tratamento.

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
11 a)	13500	4320	-	8	1	31	51	5
b)	10500	3780	-	1	13	23	56	7
12 a)	5000	2000	-	6	2	38	46	8
b)	5800	2610	-	4	3	42	45	6
13 a)	10800	5400	-	6	4	46	40	4
b)	12200	4636	-	8	2	36	54	-
14 a)	7800	3276	-	7	-	42	44	7
b)	10400	6968	-	4	2	65	29	-
15 a)	7600	3192	-	6	5	37	51	1
b)	9100	3913	-	4	4	39	50	3
16 a)	9700	2910	-	8	1	29	61	1
b)	10500	5040	-	6	3	45	44	2
17 a)	10900	5123	-	6	6	41	40	7
b)	8700	3741	-	8	12	31	45	4
18 a)	4800	1344	-	2	1	27	63	7
b)	6000	1680	1	3	2	26	56	12
19 a)	9500	3610	-	3	5	35	52	5
b)	11300	4068	-	2	6	30	58	4
20 a)	5050	2676	-	5	4	49	35	7
b)	6200	3162	-	6	4	47	40	5

Cont.

ANEXO X (CONT.) - Leucometria e diferencial leucocitária dos pacientes com Anemia Ferropriva pré (a) e pós (b) tratamento.

nº	Nº Leucócitos/mm ³	Nº absoluto de PMN/mm ³	Nº relativo (%)					
			Basófilos	Eosinófilos	Bastonetes	Segmentados	Linfócitos	Monócitos
21 a)	5400	3078	-	2	5	52	37	4
b)	6200	3472	-	3	4	52	39	2
22 a)	7500	3525	1	2	4	43	47	3
b)	9900	5247	1	5	3	50	40	1
23 a)	8000	2720	-	8	4	30	56	2
b)	14600	5986	-	5	6	35	52	2
24 a)	8000	3840	1	6	4	44	44	1
b)	11200	4032	-	6	-	36	55	3
25 a)	6500	3835	-	5	5	54	35	1
b)	7700	4312	-	8	4	52	33	3
26 a)	8800	2904	-	4	3	30	69	5
b)	7100	3479	-	3	1	48	45	3
27 a)	8500	4845	-		3	54	43	-
b)	8200	4428	-	1	4	50	44	1
28 a)	8800	3784	-	8	2	41	49	-
b)	9100	4368	-	6	5	43	44	2
29 a)	8950	3669	1	2	4	37	52	5
b)	10100	5050	-	4	5	45	44	2
30 a)	9600	6240	-		9	56	32	3
b)	20800	1268	-		14	47	36	4

ANEXO XI - Níveis séricos de ferritina dos controles.

nº	Ferritina (ng/dl)	nº	Ferritina (ng/dl)	nº	Ferritina (ng/dl)
1	32,0	27	17,0	53	72,0
2	60,0	28	21,0	54	7,0
3	28,0	29	5,0	55	17,0
4	25,0	30	13,0	56	-
5	76,0	31	12,0	57	10,0
6	27,0	32	33,0	58	30,0
7	17,0	33	21,0	59	27,0
8	30,0	34	10,0	60	76,0
9	12,0	35	54,0	61	6,6
10	30,0	36	21,0	62	44,0
11	56,0	37	60,0	63	4,0
12	12,0	38	30,0	64	20,0
13	60,0	39	30,0	65	21,0
14	25,0	40	30,0	66	70,0
15	17,0	41	14,0	67	15,0
16	-	42	26,0	68	23,0
17	42,0	43	23,0	69	66,0
18	30,0	44	30,0	70	12,0
19	17,0	45	13,0	71	46,0
20	27,0	46	16,0	72	2,0
21	8,0	47	90,0	73	33,0
22	6,2	48	16,0	74	13,0
23	56,0	49	90,0	75	35,0
24	18,0	50	27,0	76	43,0
25	19,0	51	40,0	77	23,0
26	32,0	52	27,0	78	17,0
				79	30,0
				80	90,0

ANEXO XII - Níveis séricos de ferritina dos pacientes,
pré e pós tratamento.

nº	Ferritina (ng/dl)	nº	Ferritina (ng/dl)	nº	Ferritina (ng/dl)
1	5,0	11	2,8	21	7,0
2	2,2	12	2,0	22	4,0
3	2,0	13	30,0	23	66,0
4	2,0	14	2,0	24	4,2
5	11,0	15	9,0	25	2,4
6	4,1	16	15,0	26	2,0
7	4,2	17	44,0	27	3,0
8	4,6	18	2,0	28	2,7
9	2,0	19	16,0	29	2,0
10	13,0	20	2,6	30	3,2

ANEXO XIII - Migração dos PMN dos controles , em mm/2,5x10⁵PMN/2h

nº	Quimiotaxia	Migração ao acaso	Diferencial Quimiotático	Índice Quimiotático
11	0,3	0,1	0,2	3
12	1,3	0,3	1,0	4,3
13	1,0	0,2	0,8	5
14	0,6	0,1	0,5	6
15	0,7	0,3	0,4	2,3
16	1,2	0,2	1,0	6
19	0,7	0,1	0,6	7
20	0,9	0,3	0,6	3
21	0,3	0,1	0,2	3
22	1,2	0,2	1,0	6
23	1,0	0,4	0,6	2,5
24	0,7	0,1	0,6	7
25	0,6	0,1	0,5	6
26	0,4	0,2	0,2	2
27	1,2	0,3	0,9	4
28	0,5	0,1	0,4	5
29	0,6	0,2	0,4	3
30	0,6	0,1	0,5	6
71	0,3	0,1	0,2	3
75	0,4	0,1	0,3	4

ANEXO XIV - Migração dos PMN de pacientes com Anemia Ferropriva = $\text{mm}/2,5 \times 10^5 \text{ PMN}/2\text{h}$.

nº	PRÉ				PÓS			
	Quimiotaxia	Migração ao acaso	Diferencial Quimiotático	Índice Quimiotático	Quimiotaxia	Migração ao acaso	Diferencial Quimiotático	Índice Quimiotático
1	0,7	0,3	0,4	2,3	0,6	0,2	0,4	3
2	0,4	0,2	0,3	4	0,4	0,1	0,3	4
3	0,7	0,1	0,6	7	0,8	0,1	0,7	8
4	1,2	0,3	0,9	4	1,1	0,2	0,9	5,5
5	0,9	0,3	0,6	3	0,9	0,3	0,6	3
6	1,2	0,2	1,0	6	1,0	0,2	0,8	5
7	1,0	0,2	0,8	5	1,0	0,2	0,8	5
8	1,2	0,2	1,0	6	1,2	0,2	1,0	6
9	1,0	0,3	0,7	3,3	1,0	0,2	0,8	5
10	1,1	0,2	0,9	5,5	1,1	0,2	0,9	5,5
11	0,4	0,1	0,3	4	0,4	0,1	0,3	4
12	0,6	0,1	0,5	6	0,7	0,2	0,5	3,5
13	0,6	0,2	0,4	3	0,6	0,2	0,4	3
14	0,6	0,1	0,5	6	0,6	0,1	0,5	6
15	0,8	0,2	0,6	4	0,7	0,2	0,5	3,5
16	0,9	0,3	0,6	3	0,9	0,2	0,7	4,5
17	0,6	0,2	0,4	3	0,9	0,1	0,8	9
18	0,7	0,1	0,6	7	1,0	0,2	0,8	5

cont.

ANEXO XIV (CONT.) - Migração dos PMN de pacientes com Anemia Ferropriva = $\text{mm}/2,5 \times 10^5 \text{PMN}/2\text{h}$.

nº	PRÉ				PÓS			
	Quimiotaxia	Migração ao acaso	Diferencial Quimiotático	Índice Quimiotático	Quimiotaxia	Migração ao acaso	Diferencial Quimiotático	Índice Quimiotático
19	0,9	0,2	0,7	4,5	0,6	0,2	0,4	3
20	0,8	0,2	0,6	4	0,8	0,2	0,6	4
21	0,9	0,3	0,6	3	0,9	0,2	0,7	4,5
22	1,0	0,4	0,6	2,5	1,0	0,3	0,7	3,3
23	1,2	0,3	0,9	4,0	1,0	0,3	0,7	3,3
24	0,8	0,2	0,6	4	0,8	0,2	0,6	4
25	1,1	0,2	0,9	5,5	1,0	0,2	0,8	5
26	1,0	0,2	0,8	5	0,9	0,2	0,7	4,5
27	0,6	0,1	0,5	6	0,6	0,1	0,5	6
28	0,7	0,2	0,5	3,5	0,7	0,2	0,5	3,5
29	1,0	0,2	0,8	4	1,1	0,3	0,8	3,6
30	0,6	0,2	0,4	3	0,6	0,2	0,4	3

ANEXO XV - Redução do Nitroblue Tetrazolium pelos PMN,
em repouso, e ativados pelo látex, dos con-
troles = Densidade Óptica / $2,5 \times 10^6$ PMN/15'

Nº	Repouso	Ativado	D.O.*
17	0,105	0,315	0,210
18	0,200	0,300	0,100
19	0,100	0,290	0,190
24	0,055	0,390	0,335
25	0,125	0,240	0,115
26	0,060	0,148	0,088
27	0,090	0,300	0,210
28	0,201	0,320	0,119
29	0,060	0,240	0,180
30	0,070	0,170	0,100
31	0,120	0,180	0,060
42	0,100	0,155	0,055
57	0,050	0,260	0,210
58	0,080	0,125	0,045
64	0,110	0,150	0,040
65	0,125	0,320	0,195
72	0,175	0,340	0,165
73	0,040	0,110	0,070
79	0,095	0,170	0,075
80	0,095	0,200	0,105

* diferença de densidade óptica

ANEXO XVI - Redução do Nitroblue Tetrazolium pelos PMN, em repouso e ativados pelo látex,
dos pacientes Pré e Pós tratamento = Densidade Óptica / $2,5 \times 10^6$ PMN/15'

Pré tratamento				Pós tratamento		
Nº	Repouso	Ativado	D.O.*	Repouso	Ativado	D.O.*
1	0,039	0,094	0,055	0,086	0,146	0,060
2	0,040	0,088	0,048	0,040	0,095	0,055
3	0,045	0,105	0,060	0,045	0,115	0,070
4	0,100	0,150	0,050	0,100	0,155	0,055
5	0,025	0,204	0,179	0,100	0,290	0,190
6	0,160	0,280	0,120	0,160	0,290	0,130
7	0,100	0,220	0,120	0,170	0,265	0,095
8	0,065	0,145	0,080	0,070	0,155	0,085
9	0,090	0,220	0,130	0,085	0,220	0,135
10	0,045	0,100	0,055	0,045	0,095	0,050
11	0,050	0,290	0,240	0,055	0,290	0,235
12	0,045	0,125	0,080	0,060	0,155	0,095
13	0,050	0,175	0,125	0,030	0,120	0,090
14	0,040	0,110	0,070	0,035	0,125	0,090
15	0,045	0,270	0,225	0,060	0,260	0,200
16	0,040	0,300	0,260	0,040	0,320	0,280
17	0,050	0,150	0,055	0,040	0,100	0,060
18	0,031	0,210	0,179	0,070	0,220	0,150

ANEXO XVI (CONT.) - Redução do Nitroblue Tetrazolium pelos PMN, em repouso e ativados pelo látex, dos pacientes Pré e Pós tratamento = Densidade Óptica / $2,5 \times 10^6$ PMN/15'

Nº	Pré tratamento			Pós tratamento		
	Repouso	Ativado	D.O.*	Repouso	Ativado	D.O.*
19	0,060	0,100	0,040	0,045	0,105	0,060
20	0,050	0,200	0,150	0,045	0,190	0,145
21	0,030	0,100	0,070	0,035	0,115	0,080
22	0,075	0,195	0,120	0,105	0,210	0,105
23	0,100	0,245	0,145	0,100	0,240	0,140
24	0,065	0,185	0,120	0,080	0,195	0,115
25	0,060	0,120	0,060	0,050	0,105	0,055
26	0,150	0,240	0,090	0,130	0,220	0,090
27	0,045	0,125	0,080	0,050	0,140	0,090
28	0,035	0,155	0,120	0,040	0,155	0,115
29	0,070	0,200	0,130	0,065	0,205	0,140
30	0,070	0,165	0,095	0,080	0,180	0,100

* diferença de densidade óptica A-R

ANEXO XVII- Iodinização pelos PMN dos controles e dos pacientes, pré e pós tratamento, em nanomoles de $^{131}\text{INa}/10^7\text{PMN/hora}$.

Nº	Controles	Nº	Pacientes	
			Pré	Pós
1	2,88	1	3,48	3,02
3	3,73	2	2,57	3,45
4	2,80	3	2,53	3,08
5	5,34	4	1,63	2,02
7	3,12	5	3,16	3,07
9	2,54	6	2,01	3,73
12	5,20	7	3,92	2,68
13	4,64	8	4,01	2,78
14	2,45	9	2,19	3,25
15	3,94	10	2,35	2,54
16	2,99	11	1,02	1,82
17	3,27	12	2,86	2,92
18	4,37	13	4,88	5,75
20	2,98	14	2,03	4,55
27	3,76	15	3,16	4,33
28	2,21	16	2,92	5,81
31	2,42	17	3,30	5,57
32	3,08	18	1,01	1,75
33	3,99	19	1,70	3,52
35	3,05	20	4,56	6,44
36	4,54	21	2,59	4,83
38	4,80	22	3,48	3,02
46	5,31	23	2,49	2,81
49	3,01	24	2,55	5,45
50	3,16	25	3,44	3,52
52	2,96	26	1,67	4,58
53	4,32	27	4,47	4,00
54	3,41	28	2,35	3,32
55	3,85	29	4,29	4,55
59	2,71	30	2,67	4,58

ANEXO XVII (CONT.) - Iodinização pelos PMN dos controles e dos pacientes, pré e pós tratamento, em nanomoles de $^{131}\text{INa}/10^7\text{PMN/hora}$.

Nº	Controles
61	2,92
62	5,58
63	3,06
69	3,63
70	3,99
74	2,12
76	3,15
77	2,47
78	4,97
80	3,02

ANEXO XVIII - Poder bactericida dos PMN dos controles. Nº de colônias de *Staphylococcus aureus*/5x10⁶PMN/90 minutos.

nº	Tempo zero	90 minutos	%	D
5	1800	227	12,60	0.363044
6	1750	123	7,02	0.268323
8	1752	135	7,70	0.281282
10	1594	172	10,79	0.334703
34	1871	182	9,72	0.317180
37	1784	321	7,95	0.438061
39	1910	180	9,42	0.312025
40	1839	188	10,22	0.325448
41	1870	199	10,64	0.332298
43	1650	247	14,96	0.397275
44	1900	262	13,78	0.380454
45	1920	155	8,07	0.288098
47	1760	213	12,10	0.355312
48	1634	195	11,93	0.352723
51	1830	133	7,26	0.272965
56	1624	160	9,85	0.319279
60	1850	209	11,29	0.342788
66	1695	120	7,07	0.269320
67	1900	173	9,10	0.306527
68	1868	132	7,07	0.269061

ANEXO XIX – Poder bactericida dos PMN dos pacientes pré e pós tratamento. Nº de colônias de *Staphylococcus aureus* /5x10⁶PMN/90 minutos.

nº	Pré tratamento				Pós tratamento			
	Tempo zero	90 minutos	%	D	Tempo zero	90 minutos	%	D
1	2020	325	16,09	0.412731	1945	270	13,88	0.381790
2	1840	440	23,91	0.510954	1960	352	17,96	0.437618
3	1970	460	23,35	0.504330	2020	440	21,78	0.485571
4	1760	310	17,61	0.433099	1790	315	17,60	0.432891
5	1920	275	14,32	0.388128	1840	253	12,61	0.379881
6	1950	260	13,33	0.373792	1700	110	6,47	0.257200
7	1860	320	17,20	0.427702	1935	360	18,61	0.445968
8	1830	120	6,56	0.258958	1740	130	7,47	0.276860
9	1815	170	9,96	0.311037	1910	185	9,68	0.316478
10	1600	210	13,12	0.370718	1730	180	10,40	0.328435
11	1760	214	12,15	0.356182	1705	195	11,43	0.344988
12	1850	276	14,92	0.396563	1900	310	16,32	0.415807
13	1980	380	19,19	0.453468	2080	410	19,71	0.460032
14	1945	190	9,77	0.317874	1815	170	9,36	0.311037
15	1820	225	12,36	0.359285	1705	260	15,25	0.401178

ANEXO XIX (CONT.) - Poder bactericida dos PMN dos pacientes pré e pós tratamento. Nº de colônias de *Staphylococcus aureus*/5x10⁶PMN/90 minutos.

nº	Pré tratamento				Pós tratamento			
	Tempo zero	90 minutos	%	D	Tempo zero	90 minutos	%	D
16	1980	342	17,27	0.428608	1870	312	16,68	0.420773
17	1810	480	26,52	0.540972	1720	190	11,04	0.338808
18	1775	210	11,83	0.351133	1825	201	11,40	0.338284
19	1675	125	7,46	0.276696	1615	118	7,31	0.273710
20	1990	160	8,04	0.287497	1940	170	8,76	0.300525
21	1680	165	9,82	0.318762	1610	95	5,90	0.245367
22	1720	350	20,34	0.467994	1805	360	19,94	0.462955
23	1660	240	14,46	0.390050	1560	125	8,01	0.286993
24	1910	247	12,93	0.367850	2015	260	12,90	0.267422
25	1915	188	9,82	0.318692	1870	210	11,23	0.341723
26	1775	172	9,69	0.316550	1900	181	9,52	0.313771
27	1910	324	16,96	0.424501	2090	460	22,01	0.488321
28	1880	300	15,96	0.410936	1930	310	16,06	0.412364
29	1840	214	11,63	0.348017	1720	245	14,24	0.387003
30	1710	380	22,22	0.490883	1850	340	18,38	0.443053

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMSON, J.S.; MILLS, E.L.; GIEBINK, G.S.; QUIE, P.G. Depression of monocyte and polymorphonuclear leukocyte oxidative metabolism and bactericidal capacity by influenza A virus. Infect.Immun., 35:350-355, 1982.
2. AGRUP, G.; KÄLLÉN, B.; NILSSON, O. Two-step leukocyte migration in agarose technique. Int.Arch.Allergy Appl. Immunol., 63:105-112, 1980.
3. AKINKUGBE, F.M. Prevalence of anaemia in a mal nutrition in Nigeria (Igbo-Ora) Nigerian Med J., 8:312-8, 1978. citado por WOODRUFF op cit. nº 286.
4. ALEXANDER, J.W.; WINDHORST, D.B.; GOOD, R.A. Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease. J.Lab.Clin.Med., 72:136-148, 1968.
5. AL-HADITHY, H.; ADDISON, I.E.; GOLDSTONE, A.H. Use of whole blood in the measurement of neutrophil migration. J.Clin.Pathol., 34:158-162, 1981.
6. ALLEN, R.C.; MILLS, E.L.; McNITT, T.P.; QUIE, P.G. Role of myeloperoxidase and bacterial metabolism in chemi-

- luminescence of granulocytes from patients with chronic granulomatous disease. J.Infect.Dis., 144:344-348, 1981.
7. AMBRUSO, D.R. & JOHNSTON JR., R.B. Lactoferrin enhances hydroxyl radical production by human neutrophils, neutrophil particulate fractions, and an enzymatic generating system. J.Clin.Invest., 67:352-360, 1981.
 8. AMITAI, I.; ACKER, M. Adverse effects of intramuscular iron injection. Acta haematol. (Basel), 68:341-342, 1982.
 9. ANDELMAN, M.B. & SERED, B.R. Utilization of dietary iron by term infants. Am.J.Dis.Child., 111:45-55, 1966.
 10. ANDERSEN, M.R.; ATKIN, C.L.; EYRE, H.J. Intact form of myeloperoxidase from normal human neutrophils. Arch. Biochem.Biophys., 214:273-283, 1982.
 11. ANDERSON, D.C.; HUGHES, B.J.; SMITH, C.W. Abnormal mobility of neonatal polymorphonuclear leucocytes. J. Clin.Invest., 68:863-874, 1981.
 12. ANDERSON, D.C.; WIBLE, L.J.; HUGHES, B.J.; SMITH, C.W.; BRINKLEY, B.R. Cytoplasmic microtubules in polymorphonuclear leukocytes: effects of chemotactic stimulation and colchicine. Cell, 31:719-729, 1982.

13. ANDERSON, R. & JONES, P.T. Increased leucoattractant binding and reversible inhibition of neutrophil motility mediated by the peroxidase/H₂O₂/halide system: effects of ascorbate, cysteine, dithiothreitol, levamisole and thiamine. Clin.Exp.Immunol., 47:487-496, 1982.
14. ARBETER, A.; ECHEVERRI, L.; FRANCO, D.; MUNSON, D.; VELEZ, H.; VITALE, J.J. Nutrition and infection. Fed. Proc. 30:1421-1428, 1971.
15. ATKIN, C.L.; ANDERSEN, M.R.; EYRE, H.J. Abnormal neutrophil myeloperoxidase from a patient with chronic myelocytic leukemia. Arch.Biochem.Biophys., 214:284-292, 1982.
16. BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (First of two Parts). N.Engl.J.Med., 298:659-668, 1978.
17. BABIOR, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (Second of two Parts). N.Engl.J.Med., 298:721-725, 1978.
18. BABIOR, B.M.; KIPNES, R.S.; CURNUTTE, J.T. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J.Clin.Invest., 52:741-744, 1973.
19. BAEHNER, R.L. The biochemical basis of NBT reduction in normal human and CGD PMN. Blood, 48:309-313, 1976.

20. BAEHNER, R.L. Use of the nitro blue tetrazolium test in clinical pediatrics. Am.J.Dis.Child., 128:449-451,1974.
21. BAEHNER, R.L. & JOHNSTON JR, R.B. Metabolic and bactericidal activities of human eosinophils. Br.J.Haematol., 20:277-285,1971.
22. BAEHNER, R.L.& JOHNSTON Jr, R.B. Monocyte function in children with neutropenia and chronic infections.Blood, 40:31-41, 1972.
23. BAEHNER, R.L. & NATHAN, D.G. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease.N.Engl. J.Med., 278:971-976,1968.
24. BAGGS, R.B.; MILLER, S.A. Nutritional iron deficiency as a determinant of host resistance in the rat. J. Nutr., 103:1554-1560, 1983.
25. BANWELL, J.G. & SCHAD, G.A. Hookworm. Clin.Gastroenterol., 7:129-156,1978.
26. BARAK, Y.; KAROV, Y.; LEVIN, S. Migration of human leukocytes from soft agarose droplet: A simplified method for studying chemotaxis and spontaneous migration.Am. J.Hematol., 14:271-278,1983.
27. BARNESS, L.A., MAUER, A.M.; ANDERSON, A.S.; DALLMAN, P. R.; FORBES, G.B.; HAWORTH, J.C.; JESSE, M.J.; SCRIVER,

- C.R.; WINICK, M. Iron supplementation for infants. Pediatrics, 58:765-768, 1976.
28. BARNES, L.A.; MAUER, A.M.; ANDERSON, A.S.; DALLMAN, P. R.; FORBES, G.B.; NICHOLS Jr, B.L.; ROY, C.; SMITH, N. J.; WALKER, W.A.; WINICK, M. Relationship between iron status and incidence of infection in infancy. Pediatrics, 62:246-250, 1978.
29. BARRY, D.M.J. & REEVE, A.W. Iron and neonatal infection. Lancet 2(7893): 1385-1386, 1974.
30. BECKER, E.L. Chemotaxis. J.Allergy.Clin.Immunol., 66: 97-105, 1980.
31. BECKER, E.L. & STOSSEL, T.P. Chemotaxis. Fed.Proc., 39: 2949-2952, 1980.
32. BERTON, G.; BELLAVITE, P.; DRI, P.; DE TONI, P.; ROSSI, F. The enzyme responsible for the respiratory burst in elicited guinea pig peritoneal macrophages. J.Pathol., 136:273-290, 1982.
33. BEUTLER, E.; BLAISDELL, R.K. Iron enzymes in iron deficiency. V.Succinic dehydrogenase in rat liver, kidney and heart. Blood, 15:30-35, 1960.

34. BONVINI, E.; ZEREGA, R.; MINERVINI, F.; DALLEGRI, F.; PATRONE, F.; SACCHETTI, . Neutrophil function in patients with lymphoproliferative disorders. Haematologica (Pavia), 68:38-45, 1983.
35. BOUR, H. Le fer et les infections. Bull.Acad.Natl.Med., 165:519-525, 1981.
36. BOXER, L.A.; COATES, T.D.; HAAK, R.A.; WOLACH, J. B.; HOFFSTEIN, S.; BAEHNER, R.L. Lactoferrin deficiency associate with altered granulocyte function. N.Engl. J.Med., 307:404-410, 1982.
37. BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand.J.Clin.Lab.Invest.(Suppl), 97:77-89, 1968.
38. BROCK, A. Peroxidase activity in human granulocytes, inter and intra-individual variations. Scand.J.Clin.Lab. Invest., 37:163-167, 1977.
39. BROCK, J.H. Lactoferrin in human milk: its role in iron absorption and protection against enteric infection in the newborn infant. Arch.Dis.Child., 55:417-421, 1980.
40. BROGAN, M.D. & SAGONE Jr, A.L. The metabolic response of human phagocytic cells to killed mumps particles. J. Reticuloendothel.Soc., 27:13-22, 1980.

41. BRYAN, C.F. & LEECH, S.H. The immunoregulatory nature of iron. Cell Immunol., 75:71-79, 1983.
42. BUCKLEY, R.H. Iron deficiency anemia: its relationship to infection susceptibility and host defense. J. Pediatr., 86:993-995, 1975.
43. BUENO, N.D. & JOSEPH, N.E. Anemias na infância. Cl. Ped. III:15-22, 1980.
44. BURMAN, D. Iron deficiency in infancy and childhood. Clin. Haematol., 11:339-351, 1982.
45. CALDWELL, C.W. & SPROUSE, R.F. Iron and resistance in histoplasmosis. Am. Rev. Respir. Dis., 125:674-677, 1982.
46. CAMPOS, V.; ROBESON, J.; DURAN, N.; WALDEMAR, A. New peroxides and their antimicrobial activity. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol., 11:131-133, 1978.
47. CARDELLACH, F.; FELIU, E.; MATUTES, E.; MARTI, M.; VIVES CORRONS, J.L.; JOU, J.M.; MONTESERRAT COSTA, E.; GRAENA, A.; BRUGUES, R.; ROZMAN, C. Exploración de la capacidad de desplazamiento de los granulocitos humanos. Método en soporte de agarosa. Sangre (Barc), 24:730-738, 1979.
48. CATES, K.L. Defects in neutrophil chemotaxis. Clin. Immunol. Allergy, 1:603-627, 1981.

49. CAVILL, I. Diagnostic methods. Clin.Haematol., 11:259-273, 1982.
50. CECH, P.; STALER, H.; WIDMANN, J.J.; ROHNER, A.; MIESCHER, P.A. Leukocyte myeloperoxidase deficiency and diabetes mellitus associate with Candida albicans liver abscess. Am.J.Med., 66:149-153, 1979.
51. CHANDRA, R.K. Iron and immunocompetence. Nutr.Rev., 34:129-132, 1976.
52. CHANDRA, R.K. Reduced bactericidal capacity of polymorphs in iron deficiency. Arch.Dis.Child., 48:864-866, 1973.
53. CHANDRA, R.K.; CHANDRA, S.; CHAI, O.P. Chemotaxis, random mobility, and mobilization of polymorphonuclear leucocytes in malnutrition. J.Clin.Pathol., 29:224-227, 1976.
54. CHANDRA, R.K.; SARAYA, A.K. Impaired immunocompetence associated with iron deficiency. J.Pediatr., 86:899-902, 1975.
55. CHARLTON, R.W.; BOTHWELL, T.H. Definition, prevalence and prevention of iron deficiency. Clin.Haematol., 11:309-325, 1982.
56. CHEUNG, A.T.W.; MILLER, M.E.; KELLER, S.R. Movement of human polymorphonuclear leukocytes: A videotape ana-

- lysis. J. Reticuloendothel.Soc., 31:193-205, 1982.
57. CHONAN, V.; LOWENTHAL, R.M. Effect of vinblastine, vincristine, and vindesine on neutrophil phagocytosis and iodination. Cancer Treat.Rep., 66:505-508, 1982.
58. CLARK, R.A. Neutrophil iodination reaction induced by fluoride: implications for degranulation and metabolic activation. Blood., 57:913-921, 1981.
59. CLARK, R.A.; KLEBANOFF, S.J. Neutrophil-platelet interaction mediated by myeloperoxidase and hydrogen peroxide. J.Immunol., 124:399-405, 1980.
60. CLARK, R.A.; KLEBANOFF, S.J.; EINSTEIN, A.B.; FEFER, A. Peroxidase-H₂O₂-halide system: cytotoxic effect on mammalian tumor cells. Blood., 45:161-170, 1975.
61. CLAWSON, C.C. & REPINE, J.E. Quantitation of maximal bactericidal capability in human neutrophils. J.Lab. Clin.Med., 88:316-327, 1976.
62. CLAWSON, C.C.; REPINE, J.E.; WHITE, J.G. Quantitation of bactericidal capacity in normal and abnormal neutrophils. Pediatr.Res., 6:367a, 1972.
63. CLEGG, G.A.; FITTON, J.E.; HARRISON, P.M.; TREFFRY, A. Ferritin: molecular structure and iron-storage mechanisms. Prog.Biophys.Molec.Biol., 36:56-86, 1980.

64. CLELAND, L.G.; BETTS, W.H.; VERNON-ROBERTS, B.; BIELICKI, J. Role of iron and influence of antiinflammatory drugs on oxygen derived free radical production and reactivity. J. Rheumatol., 9:885-892, 1982.
65. CLEMENT, L.T.; LEHMEYER, J.E.; GARTLAN, G.L. Identification of neutrophil subpopulations with monoclonal antibodies. Blood, 61:326-332, 1983.
66. COCCHI, P.; MORI, S.; BECATTINI, A. NBT tests in premature infants. Lancet, 27:1426-1427, 1969.
67. COHEN, H.J.; NEWBURGER, P.E.; CHOVANIEC, M.E.; WHITIN, J.C.; SIMONS, E.R. Opsonized zymosan-stimulated granulocytes - activation and activity of the superoxide generating system and membrane potential changes. Blood., 58:975-982, 1981.
68. COOK, J.D.; ALVARADO, J.; GUTNISKY, A.; JAMRA, M.; LABARDINI, J.; LAYRISSE, M.; LINARES, J.; LORÍA, A.; MASPES, V.; RESTREPO, A.; REYNAFARJE, C.; SÁNCHEZ-MEDAL, L.; VÉLEZ, H.; VITERI, F. Nutritional deficiency and anemia in Latin America: A collaborative study. Blood, 38:591-603, 1971.
69. COOK, J.D.; FINCH, C.A.; SMITH, N.J. Evaluation of the iron status of a population. Blood., 48:449-455, 1976.

70. COOK, J.D.; LIPSCHITZ, D.A.; MILES, L.E.M.; FINCH, C.A.
Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. Am.J.Clin.Nutr., 27:681-687, 1974.
71. CORBERAND, J.; BENCHEKROUN, S.; NGUYEN, F.; LAHARRAGUE, P.; PRIS, J. Polymorphonuclear functions in Hodgkin's disease patients at diagnosis, in remission, and in relapse. Cancer Res., 42:1595-1599, 1982.
72. DALLMAN, P.R. Tissue effects of iron deficiency in Biochemistry and Medicina (ed by A.Jacobs and M.Wormood) pp 437-475. Academid Pres, New York. citado por Leibel et alii op cit 159.
73. DALLMAN, P.R.; BEUTLER, E.; FINCH, C.A. Effects of iron deficiency exclusive of anaemia. Br.J.Haematol., 40: 179-184, 1978.
74. DALLMAN, P.R. & GOODMAN, J.R. Enlargement of mitochondrial compartment in iron and copper deficiency. Blood, 35:496-505, 1970.
75. DALLMAN, P.R.; SIIMES, M.A.; STEKEL, A. Iron deficiency in infancy and childhood. Am.J.Clin.Nutr., 33:86-118, 1980.
76. DALLMAN, P.R. & SCHWARTZ, H.C. Myoglobin and cytochrome response during repair of iron deficiency in the rat. J.Clin.Invest., 44:1631-1638, 1965.

77. D'AMELIO, R.; ARRANHADO, E.; LE MOLI, S.; ROSSI, P. Study of chemotaxis by a modified method of migration under agarose gel. Boll. Ist. Sieroter Milan, 58:306-314, 1979.
78. DEISS, A. Iron metabolism in reticuloendothelial cells. Semin. Hematol., 20:81-90, 1983.
79. DEL PRINCIPE, D.; MENICHELLI, A.; GALLI, E.; PERSIANI, M.; PERLINI, R.; D'ARCANGELO, C.; BUSINCO, L.; ROSSI, P. Superoxide-dependent chemotactic activity for PMNs derived from opsonized zymosan-stimulated human platelets. Pediatr. Res., 16:1000-1003, 1982.
80. DEWAR, C. An improved method for isolation of granulocytes from peripheral blood. J. Immunol. Methods., 20:301-310, 1978.
81. DOOLITTLE, R.L.; PACKMAN, C.H.; LICHTMAN, M.A. Amino-sugars enhance recognition and phagocytosis of particles by human neutrophils. Blood, 62:697-701, 1983.
82. EDGERTON, V.R.; GARDNER, G.W.; OHIRA, Y.; GUNAWARDENA, K.A.; SENEWIRATNE, B. Iron-deficiency anaemia and its effect on worker productivity and activity patterns. Br. Med. J., 2:1546-1549, 1979.
83. ELWOOD, P.C.; WATERS, W.E.; GREENE, W.J.W.; SWEETNAM, P. Symptoms and circulating haemoglobin level. J. Chronic. Dis., 21:615-628, 1969.

84. FANTONE, J.C.; WARD, P.A. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am.J.Pathol., 107:397-418, 1982.
85. FEARON, D.J. & COLLINS, L.A. Increased expression of C3b receptors on polymorphonuclear leukocytes induced by chemotactic factors and by purification procedures. J.Immunol., 130:370-375, 1983.
86. FEARON, D.T.; KANECO, I.; THOMSON, G.G. Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. J.Exp.Med., 153:1615-1628, 1981.
87. FELIU, E. CARDELLACH, F.; MATUTES, E.; VIVES CORRONS J. L.; GRAÑENA, A.; MONTSERRAT-COSTA, E.; BRUGUES, R.; ROZMAN, C. Aspectos fisiológicos del granulócito neutrófilo humano con especial referencia al quimiotactismo y a la fagocitosis. Sangre (Barc), 24:656-670, 1979.
88. FINCH, C.A. & HUEBERS, H. Perspectives in iron metabolism. N.Engl.J.Med., 306:1520-1528, 1982.
89. FINCH, C.A.; MILLER, L.R.; INAMDAR, A.R.; PERSON, R.; SEILER, K.; MACKLER, B. Iron deficiency in the rat. Physiological and biochemical studies of muscle dysfunction. J.Clin.Invest., 58:447-453, 1976.

90. FLEMING, A.F. Iron deficiency in the tropics. Clin.Haematol., 11:365-388,1982.
91. FORADORI, A.C.; LIRA, V.P.; AYALA, C,L.; GARAYAR, P.B.; GREBE, B.G. Modelo experimental de anemia ferropriva nutricional. Rev.Med.Chil., 106:339-342,1978.
92. FORDHAM, J.N.; SWETTENHAM, K.; DAVIES, P.G.; CURREY, H. L.F. Measurement of polymorphonuclear leucocyte motility under agarose by computer-linked image analysis. J.Immunol.Methods., 53:123-127, 1982.
93. GALLIN, J.I.(moderator).Discussants: WRIGHT, D.G.;MALECH, H.L.; DAVIS, J.M.; KLEMPNER, M.S.; KIRKPATRICK, C.H. Disorders of phagocyte chemotaxis. Ann.Intern.Med.,92: 520-538,1980.
94. GALLIN, J.L.; CLARK, R.A.; KIMBALL, H.R. Granulocyte chemotaxis: an improved in vitro assay employing ⁵¹Cr-labeled granulocytes. J.Immunol., 110:233-240,1973.
95. GANGE, R.W. Neutrophil chemotaxis in the presence of antibiotics: a re-evaluation using an agarose technique. Br.J.Dermatol., 103:51-59,1980.
96. GARCIA, C.P.; TOLEDANO, F.L.; VILLALOBOS, V.S. Estudio de la actividad quimiotáctica y opsónica en el recién nacido y primer año de vida. Sangre (Barc), 24:790-795, 1979.

97. GELLA, F.J.; FEGUEROLES, F.; CUSSO, R. Tecnicas de separación de leucocitos. Sangre (Barc), 24:579-592, 1979.
98. GIRALDO, M.P.; CORTES, M.T.; RUBIO-FELIX, D.; RAICHS, A. Métodos de exploración de la Opsonización-Ingestión y de la función microbicida de los granulocitos. Sangre (Barc), 24:739-750, 1979.
99. GIRALT, M.; LOZA, J.; EGURBIDE, I. Alteraciones adquiridas de la función granulocitária. Sangre (Barc), 24:715-729 1979.
100. GLASSER, L. Leukemic cells as probes for sequential functional differentiation of the human granulocyte. Am. J.Clin.Pathol., 79:45-51, 1983.
101. GLASSER, L. & FIEDERLEIN, R.L. Neutrophil migration under agarose. Am.J.Clin.Pathol., 72:956-962, 1979.
102. GOLDSTEIN, I.M. Polymorphonuclear leukocyte functions: role of the plasma membrane. Curr.Top.Hematol., 2:145-202, 1979.
103. GOLDSTEIN, I.M.; CERQUEIRA, M.; LIND, S.; KAPLAN, H.B. Evidence that the superoxide-generating system of human leukocytes is associated with the cell surface. J.Clin.Invest., 59:249-254, 1977.

104. GOLGSTEIN, I.M.; ROOS, D.; KAPLAN, H.B.; WEISSMANN, G.
Complement and immunoglobulins stimulate superoxide production by human leukocytes independently of phagocytosis. J.Clin.Invest., 56:1155-1163,1975.
105. GORDON, A.M.; ROWAN, R.M.; BROWN, T.; CARSON, H.G. Routine application of the nitroblue tetrazolium test in the clinical laboratory. J.Clin.Pathol., 26:52-56,1973.
106. GUHA, D.K.; WALIA, B.N.; TANDON, B.M. Small bowel changes in iron deficiency anemia of childhood. Arch.Dis. Child., 43:239-244,1968.
107. GUTTERIDGE, J.M.C.; ROWLEY, D.A.; HALLIWELL, B. Superoxide dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of iron salts. Biochem.J., 199:263-265,1981.
108. HAKIM, J.; CRAMER, E.; BOIVIN, P.; TROUBE, H.; BOUCHEROT, J. Quantitative iodination of human blood polymorphonuclear leukocytes. Europ.J.Clin.Invest., 5:215-219, 1975.
109. HAKIM, J.; FELIU, E.; VIVES CORRONS, J.L. Fisiologia y patologia de la actividad bactericida del granulocito neutrofilo humano. Sangre (Barc), 24:671-680,1979.
110. HALL, G.H. New sign of iron deficiency?. Lancet, 23:935, 1971.
111. HALLBERG, L. Iron absorption and iron deficiency. Hum. Nutr.Clin.Nutr., 36:259-278, 1982.

112. HAMERS, M.N. & SIPS, H.J. Molecular mechanism of the bactericidal action of myeloperoxidase- H_2O_2 -chloride. Adv. Exp. Med. Biol., 141:151-160, 1982.
113. HARVATH, L. & ANDERSEN, B.R. Defective initiation of oxidative metabolism in polymorphonuclear leukocytes. N. Engl. J. Med., 300:1130-1135, 1979.
114. HED, J.; STENDAHL, O.; SUNDQVIST, T. Differences in the association between the oxidase-dependent activity and plasma membrane receptors for IgG, C3b and concanavalin A of human neutrophils. FEBS LETT, 152:212-216, 1983.
115. HELD, A.M. & HURST, J.K. Ambiguity associated with use of singlet oxygen trapping agents in myeloperoxidase-catalyzed oxidations. Biochem. Biophys. Res. Commun., 81: 878-885, 1978.
116. HERSHKO, C.; BAR-OR, D.; GAZIEL, Y.; NAPARSTEK, E.; KONIJN, A.M.; GROSSOWICZ, N.; KAUFMAN, N.; IZAK, G. Diagnosis of iron deficiency anemia in a rural population of children. Relative usefulness of serum ferritin, red cell protoporphyrin, red cell indices, and transferrin saturation determinations. Am. J. Clin. Nutr., 34:1600-1610, 1981.
117. HILL, H.R.; HOGAN, N.A.; MITCHELL, T.G.; QUIE, P.G. Evaluation of a cytocentrifuge method for measuring neutrophil granulocyte chemotaxis. J. Lab. Clin. Med., 86: 703-710, 1975.

118. HOFFMAN, T.A. & BULLOCK, W.E. A statistical approach to the polymorphonuclear leukocyte bactericidal assay. J.Lab.Clin.Med., 81:148-156,1973.
119. HOROBIN, R.W. Selection of optimum tetrazolium salts for use in histochemistry: the value of structure-staining correlations. Histochem.J., 14:301-310,1982.
120. HOME, G.B.; SWETTENHAM, K.V.; CURREY, H.L.F. Polymorphonuclear motility: measurement by computer-linked image analysis. Blood., 56:696-700, 1980.
121. HUEBERS, H.A.; HUEBERS, E.; CSIBA, E.; RUMMEL, W.; FINCH, C.A. The significance of transferrin for intestinal iron absorption. Blood, 61:283-290,1983.
122. Iron and resistance to infection, editorial. Lancet,10: 325-326,1974.
123. IYER, G.Y.N.; ISLAM, M.F.; QUASTEL, J.H. Biochemical aspects of phagocytosis. Nature, 11:535-541,1961.
124. IZAGUIRRE, M.M.; ARELLANO, D.M.T.; RAVELO, G.Z. Prueba del nitroazul de tetrazolio modificada, en sangre de cordón umbilical y sangre periférica de sujetos normales. Alergia, XXV:135-140,1978.
125. JACOBS, A. Non-haematological effects of iron deficiency. Clin.Haematol., 11:353-364,1982.

126. JAGADEESAN, V.& REDDY, V. Complement system in iron deficiency anemia. Experientia, 39:146, 1983.
127. JAMES, J.A. & COMBES, M. Iron deficiency in the premature infant. Significance, and prevention by the intramuscular administration of iron-dextran. Pediatrics, 26:368-374, 1960.
128. JANDL, R.C.; SCHWARTZ, J.A.; BORGES-DUBOIS, L.; KIPNES, R.S.; McMURRICH, B.J.; BABIOR, B.M. Termination of the respiratory burst in human neutrophils. J.Clin. Invest., 61:1176-1184, 1978.
129. JONES, F.J. Interactions between human neutrophil and vaccinia virus: induction of oxidative metabolism and virus inactivation. Pediatr.Res., 16:525-529, 1982.
130. JOHN, T.J. & SIEBER Jr, O.F. Chemotactic migration of neutrophils under agarose. Life Sci., 18:177-182, 1976.
131. JOYNSON, D.H.M.; WALKER, D.M.; JACOBS, A.; DOLBY, A.E. Defect of cell-mediated immunity in patients with iron-deficiency anaemia. Lancet, 18:1058-1059, 1972.
132. JUDISCH, J.M.; NAIMAN, J.L.; OSKI, F.A. The fallacy of the fat iron-deficient child. Pediatrics, 37:987-990, 1966.

133. KALKOFEN, U.P. Intestinal trauma resulting from feeding activities of Ancylostoma caninum. Am.J.Trop.Med.Hyg., 23:1046-1053, 1974.
134. KAPLAN, E.L.; LAXDAL, T.; QUIE, P.G. Studies of polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease of childhood: bactericidal capacity for streptococci. Pediatrics, 41:591-599, 1968.
135. KELLER, H.U.; HESS, M.W.; COTTIER, H. Physiology of chemotaxis and random motility. Semin.Hematol., XII: 47-57, 1975.
136. KHAN, A.J.; EVANS, H.E.; GLASS, L.; KHAN, P.; CHANG, C. T.; NAIR, S.R. Abnormal neutrophil chemotaxis and random migration induced by aminoglycoside antibiotics. J.Lab.Clin.Med., 93:295-300, 1979.
137. KIMBER, C. & WEINTRAUB, L.R. Malabsorption of iron secondary to iron deficiency. N.Engl.J.Med., 279:453-459, 1968.
138. KJØSEN, B. & BASSØE H.H. The effect of IgG, F(ab')₂ and serum on the glucose metabolism in human leucocytes. Scand.J.Clin.Lab.Invest., 41:311-318, 1981.
139. KLEBANOFF, S.J. Antimicrobial mechanisms in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Semin. Hematol., XII:117-141, 1975.

140. KLEBANOFF, S.J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. J.Exp.Med., 126:1063-1068, 1967.
141. KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase: contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. Science, 169:1095-1097, 1970.
142. KLEBANOFF, S.J. Myeloperoxidase-halide-hydrogen peroxide antibacterial system. J.Bacteriol., 95:2131-2138, 1968.
143. KLEBANOFF, S.J. The iron-H₂O₂-iodide cytotoxic system. J.Exp.Med., 156:1262-1267, 1982.
144. KLEBANOFF, S.J.; CLARK, R.A. Iodination by human polymorphonuclear leukocytes: a re-evaluation. J.Lab.Clin.Med., 89:675-686, 1977.
145. KLEIN, R.B.; FISCHER, T.J.; GARD, S.E.; BIBERSTEIN, M.; RICH, K.C.; STIEHM, E.R. Decreased mononuclear and polymorphonuclear chemotaxis in human newborns, infants, and young children. Pediatrics, 60:467-472, 1977.
146. KLEMPNER, M.S. & GALLIN, J.I. Separation and functional characterization of human neutrophil subpopulations. Blood, 51:659-669, 1978.
147. KÖLMEL, H.W. & EGRI, T. The significance of the nitro-blue-tetrazolium test in cerebrospinal fluid granulocytes in bacterial and abacterial meningitis. Infection, 8:142-146, 1980.

148. KRAUSE, J.R. & STOLC, V. Serum ferritin and bone marrow iron stores. 1. Correlation with absence of iron in biopsy specimes. Am.J.Clin.Pathol., 72:817-820, 1979.
149. KRAUSE, J.R. Serum ferritin test and its relationship to iron deficiency. Lab.Med., 12:536-540, 1981.
150. KULAPONGS, P.; VITHAYASAI, V.; SUSKIND, R.; OLSON, R.E. Cell-mediated immunity and phagocytosis and killing function in children with severe iron-deficiency anemia. Lancet, 2:689-691, 1974.
151. LANE, T.A.; LAMKIN, G.C.; WINDLE, B.E. Phagocytosis-induced modulation of human neutrophil chemotaxis receptors. Blood, 58:228-236, 1981.
152. LANE, T.A. & LAMKIN, G.E. Myeloperoxidase-mediated modulation of chemotactic peptide binding to human neutrophils. Blood, 61:1203-1207, 1983.
153. LARROCHA, C.; CASTRO, M.F.; FONTAN, G.; VILORIA, A.; CHACÓN, J.L.F.; JIMENEZ, C. Hereditary myeloperoxidase deficiency - Study of 12 cases. Scand.J.Haematol., 29:389-397, 1982.
154. LAYRISSE, M.; APARCEDO, L.; MARTINEZ-TORRES, C.; ROCHE, M. Blood loss due to infection with *Trichuris trichiura*. Am.J.Trop.Med.Hyg., 16:613-619, 1967.

155. LE MOLI, S.; SEMINARA, R.; D'AMELIO, R.; AIUTI, F. In vitro and in vivo effect of sisomicin and gentamycin on polymorphonuclear chemotaxis and phagocytosis. Int. J. Immunopharmacol., 5:49-54, 1983.
156. LEE, G.R. The anemia of chronic disease. Semin.Hematol. 20:61-80, 1983.
157. LEHRER, R.I. The fungicidal mechanisms of human monocytes. I. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidacidal mechanisms. J. Clin.Invest., 55:338-346, 1975.
158. LEHRER, R.I.; HANIFIN, J.; CLINE, M.J. Defective bactericidal activity in myeloperoxidase-deficient human neutrophils. Nature, 223:78-79, 1969.
159. LEIBEL, R.; GREENFIELD, D.; POLLITT, E. Biochemical and behavioural aspects of sideropenia. Br.J.Haematol., 41:145-150, 1979.
160. LEONART, M.S.S. Redução do nitroblue tetrazolium e atividade fagocitária nos granulócitos neutrófilos em processos infecciosos - Trabalho experimental apresentado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas - São Paulo, 1-63, 1977.

161. LIPSCHITZ, D.A.; SKIKNE, B.A.; THOMPSON, C. Precision and accuracy of serum ferritin measurements. Am.J.Clin. Nutr., 34:951-956, 1981.
162. LOMNITZER, R.; RABSON, A.R.; KOORNHOF, H.J. Leucocyte capillary migration: an adherence dependent phenomenon. Clin. Exp.Immunol., 25:303-310, 1976.
163. LOPEZ, A.J.; HERNANDEZ, M.; PASTOR, I.; NUÑO, M.C.L.B.; OLMOS, J.M.; RIOS, A.; DE CASTRO, S. Influencia de algunos medicamentos anti-inflamatorios sobre la función de los neutrófilos. Sangre (Barc), 24:780-789, 1979.
164. LORENZI, T.F. & JAMRA, M. Anemias secundárias a parasitoses. Rev.Bras.Pesq.Med.Biol., 11:159-180, 1978.
165. LUKENS, J.N. Iron deficiency and infection. Am.J.Dis. Child., 129:160-162, 1975.
166. MAALLEM, H. & FLETCHER, J. Impaired neutrophil function and myeloperoxidase deficiency in pregnancy. Br.J.Haematol., 44:375-381, 1980.
167. MACDOUGALL, L.G.; ANDERSON, R.; MCNAB, G.M.; KATZ, J. The immune response in iron-deficient children: impaired cellular defense mechanisms with altered humoral components. J.Pediatr., 86:833-843, 1975.
168. MACKAY, H.M.M. Anaemia in infancy: its prevalence and prevention. Arch.Dis.Child., 3:117, 1928. citado por Lukens, op cit nº 165.

169. MACKLER, B.; PERSON, R.; MILLER, L.R.; INAMDAR, A.R.; FINCH, C.A. Iron deficiency in the rat; biochemical studies of brain metabolism. Pediatr. Res., 12:217-220, 1978.
170. MADANAT, F.; EL-KHATEEB, M.; TARAWANEH, M.; HIJAZI, S. (Amman). Serum ferritin in evaluation of iron status in children. Acta. haematol (Basel) 71:111-115, 1984.
171. MALAWISTA, S.E. & CHEVANCE, A.B. The cytokineplast: purified, stable, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. J. Cell. Biol., 95:960-973, 1982.
172. MANTOVANI, B. Different roles of IgG and complement receptors in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol., 115:15-17, 1975.
173. MARESCHAL, J.C.; DUBLET, B.; WUSTEFELD, C.; CHARLIER, G.; CRICHTON, R.R. Immunological characteristics of human ferritins; consequences for human serum ferritin determination. Clin. Chim. Acta., 111:99-103, 1981.
174. MARTINEZ-TORRES, C. & LAYRISSE, M. Effect of amino acids on iron absorption from a staple vegetable food. Blood, 35:669-682, 1970.
175. MARTINEZ-TORRES, C.; OJEDA, A.; ROCHE, M.; LAYRISSE, M. Hookworm infection and intestinal blood loss. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 61:373-383, 1967.

176. MARTINEZ-TORRES, C.; RENZI, M.; LAYRISSE, M. Iron Absorption by humans from hemosiderin and ferritin, further studies. J.Nutr., 106:128-135, 1976.
177. MARTINS, G.C.; SALZANO, A.C.; BATISTA FILHO, M.; VARELA, R.M. Padrões hematológicos em grupos populacionais da Zona da Mata de Pernambuco. Rev.Bras.Pesq.Med.Biol., 4:399, 1971, citado por NUSSENZVEIG et alii, op. cit nº 199.
178. MASPES, V. & TAMIGAKI, M. Importância da reabsorção do ferro da hemorragia intestinal provocada pela ação dos vermes na progressão da anemia. Rev.Saúde Pública.S. Paulo, 13:357-365, 1979.
179. MATHEISZ, J.S. & ALLEN, J.C. Fatigue of human polymorphonuclear leukocyte function associated with bacterial ingestion. Clin.Immunol.Immunopathol., 12:125-131, 1979.
180. MCCALL, C.E.; DECHATELET, L.R.; COOPER, M.R.; SHANNON, C. Human toxic neutrophils III. Metabolic characteristics. J.Infect.Dis., 127:26-33, 1973.
181. MCDONALD, R. & MARSHALL, S.R. The value of iron therapy in pica. Pediatrics, 34:558-562, 1964.
182. MCFARLANE, H.; REDDY, S.; ADCOCK, K.J.; ADESHINA, H.; COOKE, A.R.; AKENE, J. Immunity, transferrin, and survival in kwashiorkor. Br.Med.J., 4:268-270, 1970.

183. MCMILLAN, J.A.; LANDAW, S.A.; OSKI, F.A. Iron sufficiency in breast-fed infants and the availability of iron from human milk. Pediatrics, 58:686-691, 1976.
184. MILLER, M.E. Pathology of chemotaxis and random mobility. Semin. Hematol., XII:59-82, 1975.
185. MOLLISON, K.W.; CARTER, G.W.; KRAUSE, R.A. Chemotaxis of human polymorphonuclear leukocytes under agarose: lack of requirement for media protein and differential effects of buffer and agarose type on locomotion(41190). Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 167:419-427, 1981.
186. MORA, L.A.; NAVARRETE, M.; JIMÉNEZ, R.; CARRILLO, J.M.; JIMÉNEZ, E.; RAMÓN, M. Características hematológicas de las anemias nutricionales en niños. Bol.Med. Hosp. Infant.Mex., 38:923-931, 1981.
187. MOYSÊS, M.A.A. Deficiência de ferro e desenvolvimento cognitivo: um estudo experimental em escolares. Pediatr (S.Paulo), 3:217-225, 1981
188. MÜLLER, J.; ALFÖLDY, P.; LEMMEL, E.M. Nitroblue tetrazolium test for the functional evaluation of phagocytic cells: A critical analysis of the methodology: Agents Actions, 11:384-390, 1981.
189. MURPHY, K.A. & KELLEHER, J.J. An improved micromethod for evaluating the phagocytic potential of granulocy-

- tes by the nitroblue tetrazolium (NBT) slide test. Am. J. Med. Technol., 48:271-275, 1982.
190. NAIMAN, J.L.; OSKI, F.A.; DIAMOND, L.K. The gastrointestinal effects of iron deficiency anemia. Pediatrics, 33:83-99, 1964.
 191. NATHAN, D.G.; BAEHNER, R.L.; WEAVER, D.K. Failure of nitro blue tetrazolium reduction in the phagocytic vacuoles of leukocytes in chronic granulomatous disease. J. Clin. Invest., 48:1895-1904, 1969.
 192. NAUSEEF, W.M.; ROOT, R.K.; NEWMAN, S.L.; MALECH, H.L. Inhibition of zymosan activation of human neutrophil oxidative metabolism by a mouse monoclonal antibody. Blood, 62:635-644, 1983.
 193. NELSON, R.D.; FIEGEL, V.D.; SIMMONS, R.L. Chemotaxis of human polymorphonuclear neutrophils under agarose: morphologic changes associated with the chemotactic response. J. Immunol., 117:1676-1683, 1976.
 194. NETO, M.P. Anemia ferropriva na infância. Clin. Ped., IV:19-23, 1980.
 195. NEUMAN, R.E. & AINSWORTH, S.K. A simplified procedure for the assay of leukocyte chemotaxis. J. Reticuloendothel. Soc., 28:305-312, 1980.

196. NEWBURGER, P.E. Superoxide generation by human fetal granulocytes. Pediatr. Res., 16:373-376, 1982.
197. NEWBURGER, P.E.; ROBINSON, J.M.; PRYZWANKY, K.B.; ROSOFF, P.M.; GREENBERGER, J.S.; TAUBER, A.I. Human neutrophil dysfunction with giant granules and defective activation of the respiratory burst. Blood, 61:1247-1257, 1983.
198. NEWMAN, S.L. & JOHNSTON Jr, R.B. Role of binding through C3b and IgG in polymorphonuclear neutrophil function: studies with trypsin-generated C3b. J. Immunol., 123: 1839-1946, 1979.
199. NUSSENZVEIG, I.; NATALE, A.; MALHEIRO, M.E.N.; MALACO, M.M.L. Prevalência de anemia e de parasitoses intestinais em escolares do Município de São Paulo. Resultados do emprego da merenda escolar e de drogas anti-parasitárias. Rev. Paul. Med., 100:32-39, 1982.
200. O'FLAHERTY, J.T.; KREUTZER, D.L.; and WARD, P.A. Chemotactic factor influences on the aggregation, swelling, and foreign surface adhesiveness of human leukocytes. Am. J. Pathol., 90:537-550, 1978.
201. OLIVER, J.M. & BERLIN, R.D. Cytoskeleton-membrane interaction and the remodeling of the cell surface during phagocytosis and chemotaxis. Adv. Exp. Med. Biol., 155: 113-131, 1982.

202. OLIVER, J.M. & BERLIN, R.D. Surface and cytoskeletal events regulating leukocyte membrane topography. Semin. Hematol., 20:282-304, 1983.
203. OLSZON, E.; ISAKSSON, B.; NORRBY, A.; SÖLVELL, L. Food iron absorption in iron deficiency. Am.J.Clin.Nutr., 31: 106-111, 1978.
204. OLIWENSZTEIN DE RÍOS, A.; PIERI, D.; PORTILLO, J.; MOREIRA, L.; MOSQUERA, E.; HERNÁNDEZ, C.; RUSSI, D.; CADENAS, G.; DABEZIES, A. Estudio de la incidencia de la carencia de hierro en niños menores de 2 años. Arch. Pediatr.Urug., 52:120-128, 1981.
205. ORR, W. & WARD, P.A. Quantitation of leukotaxis in agarose by three different methods. J.Immunol.Methods, 20: 95-107, 1978.
206. OSKI, F.A. The nonhematologic manifestations of iron deficiency. Am.J.Dis.Child., 133:315-322, 1979.
207. OSKI, F.A.; HONIG, A.S.; HELU, B.; HOWANITZ, P. Effect of iron therapy on behavior performance in nonanemic, iron-deficient infants. Pediatrics, 71:847-880, 1983.
208. OSKI, F.A. & STOCKMAN, J.A. Anemia devida a insuficiente suprimento ou a deficiente utilização do ferro. Clin.Ped.Am.N., maio:241-256, 1980.

209. OYERINDE, J.P.O. Human Ancylostoma infections in Nigeria. Ann.Trop.Med.Parasitol., 72:363-367, 1978.
210. OWEN, G.M.; LUBIN, A.H.; GARRY, P.J. Preschool children in the United States: who has iron deficiency? J.Pediatr., 79:563-568, 1971.
211. PARK, B.H. The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. J.Pediatr., 78: 376-378, 1971.
212. PARK, B.H.; FIKRIG, S.M.; SMITHWICK, E.M. Infection and nitroblue-tetrazolium reduction by neutrophils. Lancet, 7:532-534, 1968.
213. PARK, B.H. & GOOD, R.A. N.B.T. test stimulated. Lancet, 19:616, 1970.
214. PARRY, M.F.; ROOT, R.K.; METCALF, J.A.; DELANEY, K.K.; KAPLOW, L.S.; RICHAR, W.J. Myeloperoxidase deficiency - prevalence and clinical significance. Ann.Int. Med., 95:293-301, 1981.
215. PATTERSON, K.G.; GOLDSTONE, A.H.; RICHARDS, J.D.M.; CAWLEY, J.C. Increased neutrophil peroxidase activity in acute myeloid leukaemia. Acta Haematol. (Basel), 68: 261-267, 1982.

216. PEMBER, O.S.; BARNES, K.C.; BRANDT, S.J.; KINKADE, J.M.
Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation. Blood, 61:1105-1115, 1983.
217. PEMBER, O.S. & KINKADE Jr, J.M. Differences in myeloperoxidase activity from neutrophilic polymorphonuclear leukocytes of differing density: relationship to selective exocytosis of distinct forms of the enzyme. Blood, 61:1116-1124, 1983.
218. PHILLIPS, W.A.; SHELTON, M.J.; HOSKING, C.S. Separation and detection of nitroblue tetrazolium - reducing enzymes from human polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol. Methods., 54:175-181, 1982.
219. PIEDRAS, J.; CÓRDOVA, M.S.; ALVAREZ-HERNÁNDEZ. X. Utilidad de algunos parámetros hematológicos en el diagnóstico de anemia por deficiencia de hierro en niños y mujeres. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex., 38:911-922, 1981.
220. PINCUS, S.A. & KLEBANOFF, S.J. Quantitative leukocyte iodination. N. Engl. J. Med., 284:744-750, 1971.
221. PRASAD, J.S. Leucocyte function in iron-deficiency anemia. Am. J. Clin. Nutr., 32:550-552, 1979.
222. PUJOL-MOIX, N. Aplicaciones de la prueba del NBT en clínica. Sangre (Barc), 24:801-803, 1979.

223. QUIE, P.H. Pathology of bactericidal power of neutrophils. Semin.Hematol., 12:143-160, 1975.
224. QUIE, P.G. & HILL, H.R. Granulocytophathies. D.M., 1-32, August, 1979.
225. QUIE, P.G.; WHITE, J.G.; HOLMES, B.; GOOD, R.A. In vitro bactericidal capacity of human polymorphonuclear leukocytes: diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood. J.Clin.Invest., 46:668-679, 1967.
226. REPINE, J.E.; CLAWSON, C.C.; BRUNNING, R.D. Abnormal pattern of bactericidal activity of neutrophils deficient in granules, myeloperoxidase, and alkaline phosphatase. J.Lab.Clin.Med., 88:788-795, 1976.
227. REPINE, J.E.; CLAWSON, C.C.; BURCHELL, H.B.; WHITE, J.G. Reversible neutrophil defect in patients with bacterial endocarditis. J.Lab.Clin.Med., 88:780-787, 1976.
228. REPO, H.; LEIRISALO, M.; KOSUNEN, T.U. Neutrophil chemotaxis under agarose. A statistical analysis and comparison of the chemotactic response of cells from different donors. J. Immunol. Methods, 46:227-242, 1981.

229. ROBERTSON, C.F.; THONG, Y.H.; HODGE, G.L.; CHENEY, K. Primary myeloperoxidase deficiency associated with impaired neutrophil margination and chemotaxis. Acta Paediatr.Scand., 68:915-919, 1979.
230. ROBINSON, W.A. & MANGALIK, A. The kinetics and regulation of granulopoiesis. Semin. Hematol., XII: 7-25, 1975.
231. ROOT, R.K.; METCALF, J.; OSHINO, N.; CHANCE, B. H_2O_2 release from human granulocytes during phagocytosis. J. Clin. Invest., 55:945-955, 1975.
232. ROSEN, H. & KLEBANOFF, S.J. Chemiluminescence and superoxide production by myeloperoxidase-deficient leukocytes. J.Clin. Invest., 58:50-60, 1976.
233. ROSEN, H. & KLEBANOFF, S.J. Formation of singlet oxygen by the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. J.Biol.Chem., 252:4803-4810, 1977.
234. ROSEN, H. & KLEBANOFF, S.J. Hydroxyl radical generation by polymorphonuclear leukocytes measured by electron spin resonance spectroscopy. J.Clin. Invest., 64:1725-1729, 1979.
235. ROWLAND, H.A.K. Anaemia in Dar-is-Salaam and methods for its investigation. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 60:143-169, 1966. citado por WOODRUFF op. cit. 286.

236. RYDER, M.I.; NIEDERMAN, R.; TAGGART, E.J. The cytoskeleton of human polymorphonuclear leukocytes: phagocytosis and degranulation. Anat.Rec., 203:317-327, 1982.
237. SAARINEN, U.M.; SIIMES, M.A.; DALLMAN, P.R. Iron absorption in infants: high bioavailability of breast milk iron as indicated by the extrinsic tag method of iron absorption and by the concentration of serum ferritin. J.Pediatr., 91:36-39, 1977.
238. SACKS, T.; MOLDOW, C.F.; CRADOCK, P.R.; BOWERS, T.K.; JACOB, H.S. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement - stimulated granulocytes. J.Clin. Invest., 61:1161-1167, 1978.
239. SADOWITZ, P.D. & OSKI, F.A. Iron status and infant feeding practice in an urban ambulatory center. Pediatrics, 72:33-36, 1983.
240. SAGONE, A.L.Jr & BALCERZAC, S.P. Activity of iron containing enzymes in erythrocytes and granulocytes in thalassemia and iron deficiency. Am.J.Med.Sci., 259: 350-357, 1970.
241. SALZANO, A.C. Anemias e Parasitoses. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 1974, citado por NUSSENZVEIG et alii, op. cit. nº 199.

242. SANTOS, J.J.; ARREDONDO, J.L.; VITALE, J.J. Nutrition infection and immunity. Pediatr. Ann., 12:182-194, 1983.
243. SAREEN, P.M.; LODHA, S.K.; KALRA, V.B.; UTREJA, S.R.; VIJAY, R.K. Effect of dexamethasone on bactericidal activity of human neutrophils in vitro. Indian J. Physiol. Pharmacol., 182:180-183, 1981.
244. SCHLIWA, M.; PRYZWANSKY, K.B.; EUTENEUER, U. Centrosome splitting in neutrophils: An unusual phenomenon related to cell activation and motility. Cell, 31:705-717, 1982.
245. SEGAL, A.W. Nitroblue tetrazolium tests. Lancet, 23:1248-1252, 1974.
246. SEGAL, A.W. Phagocytic and bactericidal defects in neutrophils. Clin. Immunol. Allergy, 1:581-601, 1981.
247. SEGAL, A.W.; GARCIA, R.C.; HARPER, A.M. Iodination by stimulated human neutrophils. Biochem. J., 210:215-225, 1983.
248. SELVARAJ, R.J. & BHAT, K.S. Metabolic and bactericidal activities of leukocytes in protein-calorie malnutrition. Am. J. Clin. Nutr., 25:166-174, 1972.
249. SENN, H.J. & JUNGI, W.F. Neutrophil migration in health and disease. Semin. Haematol., XII:27-45, 1975.

250. SHER, R.; ANDERSON, R.; RABSON, A.R.; KOORNHOF, H.J. Standardisation of the nitroblue tetrazolium test and factors affecting its clinical application. S.Afr.Med.J., 48:209-212, 1974.
251. SHURIN, S.B.; COHEN, H.J.; WHITIN, J.C.; NEWBURGER, P.E. Impaired granulocyte superoxide production and prolongation of the respiratory burst due to a low-affinity NADPH-dependent oxidase. Blood, 62:564-571, 1983.
252. SIGULEM, D.M.; TUDISCO, E.S.; GOLDENBERG, P.; ATHAIDE, M.M.M.; VAISMAN, E. Anemia ferropriva em crianças do município de São Paulo. Rev.Saude Publica, 12:168-178, 1978.
253. SINHA, A.K. & SWARUP-MITRA, S. Myeloperoxidase activity in polymorphonuclear neutrophils in nutritional anaemia. Trans.R.Soc.Trop.Med.Hyg., 75:758-759, 1981.
254. SNYDERMAN, R. & GOETZL, E.J. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. Science, 213: 830-837, 1981.
255. SOBOLEWSKI, S.; LAWRENCE, A.C.K.; BAGSHAW, P. Human nails and body iron. J.Clin.Pathol., 31:1068-1072, 1978.
256. SOUTHWICK, F.S. & STOSSEL, T.P. Contractile proteins in leukocyte functions. Semin. Haematol., 20 : 305-321, 1983.

257. SRIKANTIA, S.G.; BHASKARAM, C.; PRASAD, J.S.; KRISHNAMACHARI, K.A.V.R. Anaemia and immune response. Lancet, 1:1307-1309, 1976.
258. STAVRIDIS, J.; CREATSAS, G.; LOLIS, D.; TRAGA, G.; ANTONOPOULOS, M.; KASKARELIS, D. Relationships between leucocyte alkaline phosphatase and nitroblue tetrazolium reduction activities in the peripheral blood polymorphonuclear leucocytes in normal individuals. Br. J. Haematol., 47:157-159, 1981.
259. STETLER, H.C. & HUONG, A.Y. Epidemiologia de la anemia en niños de edad preescolar y sus madres en El Salvador. Arch. Latinoam. Nutr., XXXI, 676-697, 1981.
260. STOCKMAN III, J.A. Infections and iron. Am. J. Dis. Child., 135:18-20, 1981.
261. STOSSEL, T.P. How do phagocytes eat?. Ann. Int. Med., 89: 398-402, 1978.
262. STOSSEL, T.P. Phagocytosis (First of three parts). N. Engl. J. Med., 290:717-723, 1974.
263. STOSSEL, T.P. Phagocytosis (Second of three parts). N. Engl. J. Med., 290:774-780, 1974.
264. STOSSEL, T.P. Phagocytosis (Third of three parts). N. Engl. J. Med., 290:833-839, 1974.

265. STOSSEL, T.P. Phagocytosis: recognition and ingestion. Semin. Haematol., XII: 83-116, 1975.
266. STRAUSS, R.G.; MAUER, A.M.; ASBROCK, T.; SPITZER, R.E.; STITZEL, A.E. Stimulation of neutrophil oxidative metabolism by the alternate pathway of complement activation: a mechanism for the spontaneous NBT test. Blood, 45:843-849, 1975.
267. STRAUSS, R.G. Neutrophil assays as modified for infants. J.Clin.Lab.Immunol., 3:133-135, 1980.
263. STRAUSS, R.R.; PAUL, B.B.; JACOBS, A.A.; SBARRA, A.J. Role of the phagocyte in host-parasite interactions. XXVII. Myeloperoxidase- H_2O_2 - Cl^- - mediated aldehyde formation and its relationship to antimicrobial activity. Infect.Immun., 3:595-602, 1971.
269. SZARFAC, S.C. Anemia ferropriva em populações da região sul do Estado de São Paulo. Rev.Saude Pública S.Paulo, 6:125-133, 1972.
270. TAN, J.S.; WATANAKUNAKORN, C.; PHAIR, J.P. A modified assay of neutrophil function: use of lysostaphin to differentiate defective phagocytosis from impaired intracellular killing. J.Lab.Clin.Med., 78:316-322, 1971.
271. TAUBER, A.I. & BABIOR, B.M. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. J.Clin.Invest., 60:374-379, 1977.

272. TAUBER, A.I. & BABIOR, B.M. O_2 and host defense: the production and fate of O_2 in neutrophils. Photochem. Photobiol., 28:701-709, 1978.
273. TORRANCE, J.D.; CHARLTON, R.W.; SIMON, M.O.; LYNCH, S.R.; BOTHWELL, T.H. The mechanism of endotoxin-induced hypoferraemia. Scand.J.Haematol., 21:403-410, 1978.
274. TSAN, M.F. Myeloperoxidase-mediated oxidation of methionine and amino acid decarboxylation. Infect. Immun., 36:136-141, 1982.
275. VAN HEERDEN, C.; OOSTHUIZEN, R.O.; VAN MYK, H.; PRINSLOO, P.; ANDERSON, R. Evaluation of neutrophil and lymphocyte function in subjects with iron deficiency. S.Afr.Med. J., 24:111-113, 1981.
276. VERNET-NYSSEN, M. Recent finding concerning serum iron, the iron binding capacity of serum, and transferrin saturation suggested terminology. Ann.Biol.Clin. (Paris), 39:301-307, 1981.
277. VIANA, M.B.; GOULART, L.M.H.F.; BASQUES, R.D. Recomendações sobre o uso de ferro profilático no lactente. J. Pediatr., 49:384-388, 1980.
278. VOORHESS, M.L.; STUART, M.J.; STOCKMAN, J.A.; OSKI, F. A. Iron deficiency anemia and increased urinary norepinephrine excretion. J.Pediatr., 86:542-547, 1975.

279. WADE, B.H. & MANDELL, G.L. Polymorphonuclear leukocytes: dedicated professional phagocytes. Am.J.Med., 74: 686-693, 1983.
280. WARD, P.A.; COCHRANE, C.G.; MÜLLER-EBERHARD, H.J. The role of serum complement in chemotaxis of leukocytes in vitro. J.Exp.Med., 122:327-347, 1965.
281. WEINBERG, E.D. Iron and infection. Microbiol.Rev., 42: 45-66, 1978.
282. WELCH, W.D.; ROSE, D.M.; CARLSON, R. Reduced hemoglobin as an inhibitor of human polymorphonuclear leukocyte bacterial killing. Surgery, 91:75-80, 1982.
283. WILKINSON, A.C.; HASTON, W.S.; SHIELDS, J.M. Some determinants of the locomotory behaviour of phagocytes and lymphocytes in vitro. Clin.Exp.Immunol., 50:461-473, 1982.
284. WINTROBE, M.M. Iron deficiency and iron-deficiency anemia. Capítulo 23 in WINTROBE, M.M. Clinical Hematology, 617-645, 1981. 8ª edição, Lea & Febiger.
285. WOODRUFF, A.W. Recent work concerning anemia in the tropics. Semin.Hematol., 19:141-147, 1982.
286. WOODRUFF, A.W. Recent work on anaemias in the tropics. Br.Med.Bull., 28:92-95, 1972.

287. WORWOOD, M. Ferritin in human tissues and serum. Clin. Haematol., 11:275-307, 1982..

288. WORWOOD, M.; GRAFF, S.J.; WILLIAMS, A.M.; WAGSTAFF, M.; JACOBS, A. The clearance of ^{131}I -human plasma ferritin in man. Blood, 60:827-833, 1982.

289. YEGIN, O. Chemotaxis in childhood. Pediatr. Res., 17 : 183-187, 1983.

290. YETGIN, S.; ALTAY, C.; CILIV, G.; LALELI, Y. Myeloperoxidase activity and bactericidal function of PMN in iron deficiency. Acta haematol (Basel), 61:10-14, 1979.

291. YIP, R.; SCHWARTZ, S.; DEINARD, A.S. Screening for iron deficiency with the erythrocyte protoporphyrin test. Pediatrics, 72:214-219, 1983.

292. YUNES, J. & MARCONDES, E. Classificação da desnutrição. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, 30:484-489, 1975.

293. ZGLICZYNSKI, J.M.; STELMASZYNSKA, T.; OSTROWSKI, W. Myeloperoxidase of human leukaemic leukocytes: oxidation of amino acids in the presence of hydrogen peroxide. Eur. J. Biochem., 4:540-547, 1968. citado por BABIOR op. cit. 16

294. ZIGMOND, S.H. & HIRSCH, J.G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. J. Exp. Med., 137:387-410, 1973.

295. ZULIANI, A. Estudo da atividade bactericida dos neutrófilos em recém-nascidos. Dissertação ao Nível de Mestrado em Pediatria apresentada à Universidade Federal do Paraná - Curitiba, 1-56, 1977.